



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 345 993**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05814066 .6**

96 Fecha de presentación : **14.09.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1802775**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.07.2007**

54 Título: **Método para el tratamiento con bucindolol basado en direccionamiento genético.**

30 Prioridad: **14.09.2004 US 609689 P**
17.09.2004 US 610706 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.10.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.10.2010

73 Titular/es: **The Regents of the University of
Colorado, a Body Corporate**
1800 Grant Street, 8th Floor
Denver, Colorado 80203, US

72 Inventor/es: **Bristow, Michael y**
Liggett, Stephen, B.

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 345 993 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para el tratamiento con bucindolol basado en direccionamiento genético.

5 1. Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la farmacogenética y la cardiología. Más específicamente, la presente invención se refiere a métodos para la terapia individualizada de la insuficiencia cardíaca con bucindolol basándose en el genotipo de un paciente de los polimorfismos en genes de receptores adrenérgicos, incluyendo el gen del receptor adrenérgico β_1 (β_1 AR) y el gen del receptor adrenérgico α_{2c} (α_{2c} AR).

2. Descripción de la técnica relacionada

Según la Asociación Americana del Corazón ("American Heart Association") (AHA), aproximadamente 62 millones de estadounidenses tienen alguna forma de enfermedad cardiovascular, que puede incluir tensión arterial alta, cardiopatía coronaria (ataque al corazón y angina de pecho), accidente cerebrovascular, defectos de nacimiento del corazón y los vasos sanguíneos e insuficiencia cardíaca congestiva, y cerca de un millón mueren debido a tales estados cada año. El informe anual de la AHA establece además que la enfermedad cardiovascular mata a más estadounidenses que las siguientes siete causas de muerte combinadas, incluyendo el cáncer. Sorprendentemente, ligeramente más mujeres que hombres, globalmente, tienen alguna enfermedad cardiovascular. Las cardiopatías representaron el 40% de todas las muertes en los EE.UU. en 1999. A pesar de los recientes avances en el tratamiento, la mortalidad debida a insuficiencia cardíaca es aproximadamente del 50% en un plazo de 5 años.

Sólo en los Estados Unidos hay aproximadamente seis millones de personas, aproximadamente el 1,5% de la población, con insuficiencia cardíaca crónica ("IC"), y se diagnostican 550.000 pacientes nuevos cada año. La terapia médica ha avanzado en el tratamiento de la IC, pero la morbilidad y la mortalidad siguen siendo altas (Mann *et al.*, 2005). El criterio actual de atención en la IC implica el uso de inhibidores (inhibidores de ACE, ARB y/o antagonistas del receptor de aldosterona) del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) y β -bloqueantes, que inhiben de manera competitiva los receptores β -adrenérgicos en los cardiomiocitos. Los β -bloqueantes son eficaces en la reducción de la mortalidad y se consideran la clase farmacológica para IC más eficaz globalmente, pero aun así funcionan en sólo el 50-60% de los pacientes tratados. Además, los datos clínicos de pacientes estadounidenses sobre la eficacia de los β -bloqueantes aprobados en ensayos de mortalidad son menos impresionantes, mostrando los datos publicados del único gran ensayo de mortalidad de intención de tratar un aumento en la mortalidad en pacientes estadounidenses frente a placebo.

Por consiguiente, existe una necesidad sustancial de terapias para IC mejoradas que tengan tasas de respuesta y eficacia superiores, se toleren mejor y se adecuen mejor a subpoblaciones con necesidades especiales, tales como diabéticos. Sin embargo, el desarrollo de nuevos agentes contra estos antecedentes terapéuticos ha resultado extremadamente desafiante. Desde 2001, de 13 ensayos de fase III en IC sólo tres han sido positivos. Dos de estos ensayos positivos fueron con un ARB (candesartan) (McMurray *et al.*, 2003; Granger *et al.*, 2003). El tercer ensayo positivo, el ensayo A-HeFT con BiDil (una combinación de dinitrato de isosorbida e hidralazina) fue en un subconjunto (afroamericanos) que comprende sólo el 12% de la población con IC estadounidense (Taylor *et al.*, 2004). Claramente, existe una necesidad continuada de desarrollar la siguiente generación de fármacos para la IC.

Aunque se usan agonistas de β_1 para tratar el deterioro agudo de pacientes con función ventricular insuficiente, una exposición prolongada del corazón a los agonistas administrados, o la elevada cantidad de agonistas de catecolaminas producida por el cuerpo, conduce a un empeoramiento de la insuficiencia cardíaca. En cambio, los antagonistas de receptores β -adrenérgicos (denominados β -bloqueantes) han surgido como una modalidad de tratamiento importante en la insuficiencia cardíaca crónica.

A principios de la década de 1990, un grupo de investigadores estadounidenses sobre insuficiencia cardíaca que trabajaban con agentes β -bloqueantes en la insuficiencia cardíaca decidieron que se requería un ensayo de mortalidad con el fin de validar esta terapia todavía controvertida. Un grupo de estadounidenses redactaron el borrador de un protocolo y una solicitud de subvención que posteriormente se aprobó para su financiación por el Programa de Estudios Clínicos Cooperativos del VA y el NHLBI. El protocolo aprobado no especificaba un fármaco, sino que en su lugar estipulaba que se seleccionaría un β -bloqueante óptimo basándose en el potencial de éxito y solidez de los datos de fase II. Los fármacos que se consideraron fueron carvedilol, tartrato de metoprolol, succinato de metoprolol CR/XL y bucindolol. Se rechazó el tartrato de metoprolol debido a los efectos poco prometedores sobre la mortalidad del ensayo MDC (Waagstein *et al.*, 1993); no se seleccionó el succinato de metoprolol CR/XL debido a una falta de datos de tolerabilidad y eficacia en la insuficiencia cardíaca; y no se seleccionó el carvedilol en parte debido a la escasa tolerabilidad en la insuficiencia cardíaca avanzada (Krum *et al.* 1995). El bucindolol fue la elección unánime del comité de selección, basándose en su excelente tolerabilidad (Eichhorn *et al.*, 1997; Gilbert *et al.*, 1990; Bristow *et al.*, 1994; Pollock *et al.*, 1990), eficacia (Gilbert *et al.*, 1990; Bristow *et al.*, 1994; Pollock *et al.*, 1990; Eichhorn *et al.*, 1990) y el nivel de interés de su promotor. El bucindolol se convirtió así en el objeto del ensayo de evaluación de la supervivencia de betabloqueantes ("BEST", *Beta Blocker Evaluation of Survival Trial*), el primer ensayo de mortalidad planificado e iniciado en la IC.

El ensayo BEST comenzó en 1995 y terminó en 1999. Tras iniciarse BEST, se planificaron e iniciaron otros tres ensayos de mortalidad, MERIT-HF con succinato de metoprolol CR/XL (MERIT-HF Study Group, 1999), CIBIS-II con bisoprolol (CIBIS-II Investigators, 1999) y COPENICUS con carvedilol (Packer *et al.*, 2002). Debido a la inscripción más rápida y menos restrictiva de estos ensayos, CIBIS-II y MERIT-HF se terminaron antes que BEST, y ambos ensayos tuvieron resultados positivos.

El ensayo BEST se terminó prematuramente en 1999, antes de su finalización, debido en parte a una pérdida de equiponderación por los investigadores, y una tasa de inclusión acelerada con respecto a β -bloqueantes de etiqueta abierta basándose en el conocimiento de los otros dos ensayos positivos (BEST Trial Investigators, 2001; Domanski *et al.*, 2003). El promotor decidió no proseguir con el desarrollo comercial del bucindolol basándose en los resultados conocidos en el momento en el que se detuvo el ensayo. Aunque los investigadores de BEST observaron un beneficio en la clase III, sujetos no afroamericanos, que era similar a los resultados positivos notificados seis meses antes en CIBIS II y MERIT-HF, los investigadores observaron malos resultados en la clase IV y pacientes afroamericanos. Además, BEST no cumplió su criterio de valoración primario de mortalidad por cualquier causa (reducción del 10%, $p = 0,10$) cuando se detuvo el ensayo (BEST Trial Investigators, 2001). Los investigadores propusieron que las diferencias entre los resultados de otros β -bloqueantes y bucindolol podrían ser atribuibles a las “propiedades farmacológicas únicas del bucindolol” (BEST Trial Investigators, 2001), lo que destaca las distinciones observadas entre las propiedades funcionales y químicas de esta clase diversa de compuestos.

Además, aún cuando la mayoría de ensayos con β -bloqueantes en insuficiencia cardíaca han demostrado efectos beneficiosos para grupos, existe una variabilidad sustancial entre individuos en el desenlace que no se explica mediante las características clínicas iniciales (CIBIS-II Investigators, 1999). La variabilidad entre individuos en la respuesta a la terapia farmacológica se reconoce con prácticamente todos los fármacos. En circunstancias tales como el tratamiento de la insuficiencia cardíaca crónica con β -bloqueantes, en el que la morbilidad y la mortalidad son altas, el algoritmo de ajuste es complejo, la variabilidad entre individuos es sustancial y existen opciones de tratamiento adicionales (la evaluación de la probabilidad de una respuesta a largo plazo favorable (o adversa) a la terapia farmacológica puede tener un impacto significativo sobre la toma de decisiones). La mortalidad a 5 años de aproximadamente el 50% de los pacientes con insuficiencia cardíaca ha impulsado un intenso estudio de opciones de tratamiento y ha conducido a regímenes de múltiples fármacos que incluyen normalmente un β -bloqueante, un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina (o antagonista de los receptores de angiotensina), diuréticos y digoxina. La terapia con β -bloqueantes se inicia en pacientes relativamente estables, a bajas dosis (es decir, aproximadamente 10 mg), y se aumenta lentamente a lo largo de un periodo de meses hasta o bien una dosis objetivo o bien una dosis que se tolera. Los ajustes en la dosificación de otros fármacos, o el inicio del tratamiento con fármacos adicionales no son comunes durante el periodo de ajuste ascendente de la dosis. Por tanto, el tratamiento de la insuficiencia cardíaca con β -bloqueantes debe individualizarse. De hecho, la afirmación “la dosificación debe individualizarse y monitorizarse estrechamente” se encuentra en la información para el paciente de las dos preparaciones de β -bloqueantes aprobadas para tratar la insuficiencia cardíaca en los EE.UU. Además, los estudios en modelos animales y seres humanos sugieren que la reversión promovida por β -bloqueantes de la remodelación celular y global del corazón con insuficiencia puede requerir meses de terapia estable (Lowe *et al.*, 2002). Se ha observado una variabilidad sustancial en las respuestas a los β -bloqueantes, incluyendo cambios de la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) (van Campen *et al.*, 1998), tolerancia al ejercicio (Bolger, 2003) y supervivencia (Packer *et al.*, 2001). No obstante, basándose en la preponderancia de los datos, debe considerarse la terapia con β -bloqueantes para la mayoría de los pacientes con insuficiencia cardíaca crónica, suponiendo que no existen contraindicaciones tales como sobrecarga de volumen, requisito de infusiones inotrópicas, bradicardia, inestabilidad hemodinámica y asma.

En consecuencia, no sólo se observaron diferencias entre los diversos β -bloqueantes, particularmente bucindolol en comparación con otros β -bloqueantes, sino que también se ha observado variabilidad entre pacientes en sus capacidades para responder de manera favorable a una terapia con β -bloqueantes particular. Se necesitan pruebas del valor terapéutico del bucindolol, particularmente pruebas que expliquen estas diferencias entre individuos.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona métodos para la terapia individualizada de la enfermedad cardiovascular basándose en la identificación de polimorfismos en receptores adrenérgicos que afectan a la respuesta de un individuo a bucindolol. En ciertas realizaciones, se refiere a la terapia individualizada para la insuficiencia cardíaca.

En ciertas realizaciones, existen métodos para evaluar el tratamiento con bucindolol para un paciente que comprende obtener información de secuencia referente a al menos un polimorfismo en un gen de receptor adrenérgico del paciente, en los que dicha información de secuencia comprende o bien la secuencia en la posición de nucleótido 1165 en la secuencia codificante en uno o ambos de los alelos de β_1 AR del paciente, o bien el aminoácido en la posición 389 de las proteínas de β_1 AR del paciente; y/o en los que dicha información de secuencia comprende si la secuencia de nucleótidos en las posiciones 964-975 se ha delecionado en uno o ambos de los alelos de α_{2c} AR del paciente, si la secuencia de aminoácidos en las posiciones 322-325 se ha delecionado en las proteínas de α_{2c} AR del paciente, en los que es probable que el paciente presente una respuesta positiva a bucindolol si el paciente es homocigoto para Arg389 en el gen β_1 AR o si el paciente es homocigoto de tipo natural en el gen α_{2c} AR. En realizaciones particulares, el gen de receptor adrenérgico es β_1 AR o α_{2c} AR. En algunos casos, se obtiene información de secuencia sobre un polimorfismo en ambos genes.

Además, los polimorfismos incluyen uno en la posición de nucleótido 1165 en el gen del receptor adrenérgico β_1 (β_1 AR) que corresponde a la posición de aminoácido 389 en la proteína codificada y otro en las posiciones de nucleótido 964-975 del gen α_{2c} AR que corresponde a las posiciones de aminoácido 322-325 en la proteína codificada.

5 La invención se basa en la determinación por los inventores de que ser homocigoto en el gen β_1 AR para codificar para una arginina en la posición 389 en el producto génico dota al paciente de una fisiología que es susceptible del tratamiento con bucindolol. Además, la invención se basa en la determinación de que una delección en el gen α_{2c} AR que conduce a una delección de los aminoácidos 322-325 en el producto génico es perjudicial para el tratamiento de estadios más avanzados de insuficiencia cardíaca con bucindolol. El término “tratamiento” se entenderá que se refiere a una terapia con respecto a un paciente al que se le ha diagnosticado una enfermedad cardiovascular o con síntomas cardiovasculares, en oposición a medidas preventivas.

10 Se entiende en general que los polimorfismos se producen en el contexto de genes; sin embargo, en el caso de polimorfismos que afectan al producto génico codificado, una alteración en ese producto génico también puede denominarse polimorfismo.

20 Según la invención, los métodos incluyen evaluar si se debe prescribir o administrar bucindolol a un paciente con enfermedad cardiovascular, comprendiendo obtener información del paciente referente a sus polimorfismos en genes de receptores adrenérgicos y/o sus productos génicos codificados que afectan a una respuesta a bucindolol.

25 Por tanto, la presente invención se refiere a obtener la información referente a polimorfismos en las proteínas de β_1 AR y/o α_{2c} AR directamente o según se deduzca determinando la secuencia de nucleótidos en la posición 1165 en el gen β_1 AR y/o las posiciones 964-975 en el gen α_{2c} AR, y prescribir o administrar bucindolol basándose en la información obtenida. Se entenderá que los ácidos nucleicos afines para la proteína de β_1 AR o α_{2c} AR incluyen el transcrito de ARNm que codifica para la proteína, ambas cadenas de cualquier ADNc generado a partir del transcrito de ARNm, y ambas cadenas del ADN genómico para el gen β_1 AR o α_{2c} AR.

30 El conocimiento sobre qué polimorfismo tiene un paciente con enfermedad cardiovascular en la posición 389 del β_1 AR y/o las posiciones 322-325 de α_{2c} AR proporciona la base para evaluar si se debe administrar o prescribir bucindolol al paciente.

La presente invención identifica además pacientes con insuficiencia cardíaca que responderán positivamente al tratamiento usando β -bloqueantes, específicamente bucindolol.

35 La presente invención también proporciona dispositivos y composiciones para la administración de β -bloqueantes, específicamente bucindolol, a un individuo que necesita tal terapia.

40 El método de la presente invención comprende determinar el genotipo de un paciente con insuficiencia cardíaca en el gen β_1 AR del individuo, en el que es probable que el paciente presente una respuesta positiva a una dosis convencional de bucindolol si el paciente no es un portador de β_1 Gly389 (es decir, que tiene uno o dos alelos con Gly389). En una realización, se prescribe bucindolol para un paciente con insuficiencia cardíaca que es homocigoto para β_1 Arg389. El método de la presente invención contempla además prescribir o administrar una dosis convencional de bucindolol a un paciente que necesita tal terapia basándose en el conocimiento de que el paciente es “homocigoto para β_1 Arg389”, lo que significa que ambos genes β_1 AR del paciente codifican para una arginina en la posición 389 en los productos génicos. Los métodos de la invención implican prescribir o administrar bucindolol a pacientes que son homocigotos para β_1 Arg389 y esto es independientemente de cómo se determina que el paciente tiene ese genotipo.

50 En realizaciones adicionales, el método de la presente invención comprende determinar el genotipo de un paciente con insuficiencia cardíaca en el gen α_{2c} AR del individuo, en el que es probable que el paciente presente una respuesta positiva a una dosis convencional de bucindolol si el paciente no es un portador de α_{2c} Del322325. En ciertas realizaciones, se prescribe bucindolol para un paciente con insuficiencia cardíaca que es homocigoto para α_{2c} de tipo natural en las posiciones de aminoácido 322-325 (es decir, los aminoácidos no están delecionados). El método de la presente invención contempla además prescribir o administrar una dosis convencional de bucindolol a un paciente que necesita tal terapia basándose en el conocimiento de que el paciente es “homocigoto para α_{2c} AR de tipo natural”, lo que significa que el paciente no tiene una delección en la secuencia del gen α_{2c} AR que codifica para los aminoácidos 322-325 en α_{2c} AR. Los métodos de la invención implican prescribir o administrar bucindolol a pacientes que son homocigotos de tipo natural para la delección (no es un portador de la delección) y esto es independientemente de cómo se determina que el paciente tiene ese genotipo.

60 Se contempla que en ciertas situaciones, puede genotiparse un paciente para uno de estos polimorfismos y entonces se realiza una determinación posterior con respecto al otro polimorfismo; en este escenario, se evalúan dos muestras diferentes. Alternativamente, puede obtenerse una única muestra y evaluarse para determinar dos polimorfismos separados. En otra realización, se prescribe bucindolol para un paciente con insuficiencia cardíaca que tiene el diplotipo de homocigoto para β_1 Arg389 y homocigoto para α_{2c} AR de tipo natural. El método de la presente invención contempla además prescribir o administrar una dosis convencional de bucindolol a un paciente que necesita tal terapia basándose en el conocimiento de que el paciente es homocigoto para β_1 Arg389 o para α_{2c} de tipo natural, o la combinación diplotípica.

El método de la presente invención también comprende determinar si es probable que individuos que tienen estados fisiopatológicos similares, tales como pero sin limitarse a, cardiomiopatía dilatada, cardiomiopatía isquémica, cardiopatía isquémica (angina, infarto de miocardio), feocromocitoma, migrañas, arritmias cardíacas, hipertensión y diversos trastornos de la ansiedad respondan positivamente a una dosis convencional de bucindolol basándose en si el individuo es homocigoto para Arg389 en el gen β_1 AR del individuo (y no un portador de la Gly389) y/o si el individuo es homocigoto de tipo natural para el gen α_{2c} AR y no un portador de la α_{2c} Del322-325.

En ciertas realizaciones, la invención se refiere a métodos para evaluar el tratamiento con bucindolol para un paciente que comprenden conocer o bien (i) la secuencia en la posición de nucleótido 1165 de una o ambas secuencias codificantes de los genes β_1 AR del paciente o bien (ii) el aminoácido en la posición 389 de las proteínas de β_1 AR del paciente, en los que el individuo está considerándose para el tratamiento con bucindolol.

En realizaciones adicionales, la invención se refiere a métodos para evaluar el tratamiento con bucindolol para un paciente que comprenden conocer si hay una delección o bien (i) en la secuencia en las posiciones de nucleótido 964-975 de uno o ambos de los alelos de α_{2c} AR del paciente o bien (ii) en los aminoácidos en las posiciones 322-325 de las proteínas de α_{2c} AR del paciente, en los que el individuo está considerándose para el tratamiento con bucindolol.

Se contempla que no todas las proteínas del paciente se evaluarán en cualquier realización de la invención, sino que se obtendrá una muestra y se evaluarán algunas de las proteínas en la muestra para determinar su secuencia proteica.

También se contempla que el término “conocer” se use según su significado sencillo y normal para hacer referencia a tener la información especificada. Se contempla que normalmente un profesional médico evaluará si se debe prescribir o administrar a un paciente bucindolol y en la realización de esa evaluación el profesional ordenará una o más pruebas referentes a uno o ambos de los alelos de β_1 AR del paciente o sus proteínas codificadas y/o referentes a uno o ambos de los alelos de α_{2c} AR del paciente o sus proteínas codificadas. En el contexto de los polimorfismos tratados en el presente documento, los términos “alelo” y “gen” se usan de manera intercambiable.

Otros aspectos de la invención describen métodos para tratar un paciente con un estado cardíaco que pueden comprender administrar o prescribir al paciente una cantidad eficaz de bucindolol, en los que el paciente no tiene niveles detectables de una proteína de β_1 AR con una glicina en la posición 389 o en los que el paciente es homocigoto para una citosina en la posición 1165 en la secuencia codificante de nucleótidos de ambos alelos de β_1 AR. En cualquier caso, un médico u otro profesional médico puede prescribir o administrar bucindolol si se da cuenta de que el bucindolol es un medicamento apropiado para ese paciente en virtud de que ese paciente tiene el polimorfismo Arg389/Arg389 en el gen β_1 AR.

Alternativa o adicionalmente, los métodos para tratar un paciente con un estado cardíaco pueden comprender administrar o prescribir al paciente una cantidad eficaz de bucindolol, en los que el paciente no tiene niveles detectables de una proteína de α_{2c} AR con una delección de los aminoácidos 322-325 o en los que el paciente es homocigoto para la presencia de los nucleótidos 964-975 (“sin delección”) en la secuencia codificante de ambos alelos de α_{2c} AR. En cualquier caso, un médico u otro profesional médico puede prescribir o administrar bucindolol si se da cuenta de que el bucindolol es un medicamento apropiado para ese paciente en virtud de que ese paciente no es un portador del polimorfismo Del322-325 en el gen α_{2c} AR, es decir, no es heterocigoto ni homocigoto para la delección.

Los métodos adicionales incluyen evaluar si un paciente con insuficiencia cardíaca responderá positivamente a un bucindolol comprendiendo: a) obtener información que indique i) la presencia de un polimorfismo en la posición codificante 1165 en la secuencia codificante de uno o ambos genes β_1 AR del paciente o ii) la presencia de un polimorfismo en el aminoácido en la posición 389 de la proteína de β_1 AR; y b) prescribir o administrar bucindolol.

Además, otros métodos descritos por la invención implican tratar un paciente con bucindolol comprendiendo: a) obtener información que indique i) la presencia de un polimorfismo en la posición codificante 1165 en la secuencia codificante de uno o ambos alelos de β_1 AR del paciente o ii) la presencia de un polimorfismo en el aminoácido en la posición 389 de la proteína de β_1 AR; y b) o bien prescribir terapia con bucindolol para el paciente en el que el genotipo del paciente indica que el paciente es homocigoto para Arg389 en la proteína de β_1 AR o bien no prescribir bucindolol para el paciente en el que el genotipo del paciente indica que el paciente no es homocigoto para Arg389 en la proteína de β_1 AR.

Se contempla además que la invención se refiera al uso de bucindolol en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un estado cardíaco en pacientes con el polimorfismo Arg389/Arg389 en sus genes β_1 AR. Las realizaciones tratadas con respecto a los métodos pueden implementarse en el uso de bucindolol en la fabricación de un medicamento.

Además, la presente invención se refiere a la obtención de una muestra biológica de un paciente que está considerándose para el tratamiento con bucindolol y su evaluación para detectar el polimorfismo Arg389 determinando o bien (i) la secuencia en la posición de nucleótido 1165 de una o ambas secuencias codificantes de los genes β_1 AR del paciente o bien (ii) el aminoácido en la posición 389 de las proteínas de β_1 AR del paciente. Se contempla que si se evalúan las proteínas de β_1 AR, podría buscarse si una muestra contiene cualquier proteína de β_1 AR con una glicina en 389.

Los métodos adicionales incluyen evaluar si un paciente con insuficiencia cardíaca responderá positivamente a un bucindolol comprendiendo: a) obtener información que indique si i) la secuencia de nucleótidos en las posiciones 964-975 se ha delecionado en uno o ambos de los alelos de α_{2c} AR del paciente o ii) si la secuencia de aminoácidos en las posiciones 322-325 se ha delecionado en las proteínas de α_{2c} AR del paciente; y b) prescribir o administrar bucindolol. Se contempla que si se evalúan las proteínas de α_{2c} AR, podría buscarse si una muestra contiene cualquier proteína de α_{2c} AR con la delección relevante.

Además, otros métodos descritos por la invención implican tratar un paciente con bucindolol comprendiendo: a) obtener información que indique si i) la secuencia de nucleótidos en las posiciones 964-975 se ha delecionado en uno o ambos de los alelos de α_{2c} AR del paciente o ii) si la secuencia de aminoácidos en las posiciones 322-325 se ha delecionado en las proteínas de α_{2c} AR del paciente; y b) o bien prescribir terapia con bucindolol para el paciente en el que el genotipo del paciente indica que el paciente es homocigoto de tipo natural en los alelos de α_{2c} AR o bien no prescribir bucindolol para el paciente en el que el genotipo del paciente indica que el paciente no es homocigoto de tipo natural en la proteína de α_{2c} AR.

Se contempla además que la invención se refiera al uso de bucindolol en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un estado cardíaco en pacientes con el polimorfismo 322-325 tipo natural homocigoto en sus alelos de α_{2c} AR. Las realizaciones tratadas con respecto a los métodos pueden implementarse en el uso de bucindolol en la fabricación de un medicamento.

Además, la presente invención se refiere a la obtención de una muestra biológica de un paciente que está considerándose para el tratamiento con bucindolol y su evaluación para detectar el polimorfismo Arg389 en la proteína de β_1 AR y/o el polimorfismo Del322-325 en la proteína de α_{2c} AR determinando (i) la secuencia en la posición de nucleótido 1165 de una o ambas secuencias codificantes de los alelos de β_1 AR del paciente; (ii) el aminoácido en la posición 389 en las proteínas de β_1 AR del paciente; iii) si hay una delección en los nucleótidos 964-975 en la secuencia codificante de uno o ambos alelos de α_{2c} AR; y/o iv) si hay una delección de los aminoácidos 322-325 en las proteínas de α_{2c} AR del paciente.

Para llevar a cabo estos métodos, un doctor, un profesional médico o su personal pueden obtener una muestra biológica para su evaluación. El profesional o su personal pueden analizar la muestra, o pueden enviarla a un laboratorio independiente o externo. El profesional médico puede tener conocimiento de si la prueba está proporcionando información referente a los alelos o genes β_1 AR del paciente según se distinguen de las proteínas codificadas, o el profesional médico puede ser consciente sólo de que la prueba indica directa o indirectamente que el genotipo del paciente refleja el fenotipo Gly389/Gly389 (secuencia “homocigota para Gly”), el fenotipo Arg389/Gly389 (secuencia “heterocigota”) o el fenotipo Arg389/Arg389 (secuencia “homocigota para Arg” u “homocigota de tipo natural”).

De manera similar, el profesional médico puede tener conocimiento de si la prueba está proporcionando información referente a los alelos o genes α_{2c} AR del paciente según se distinguen de las proteínas codificadas, o el profesional médico puede ser consciente sólo de que la prueba indica directa o indirectamente que el genotipo del paciente refleja la secuencia homocigota de tipo natural (sin delección en cualquier alelo), el fenotipo Del322-325 heterocigoto (secuencia “heterocigota”) o el fenotipo Del322-325/Del322-325 (secuencia de “delección homocigota”).

En algunas realizaciones tratadas en los ejemplos, un paciente con o bien la secuencia heterocigota o bien la secuencia homocigota para Gly con respecto a β_1 AR se denomina “portador de Gly”. Asimismo, un paciente con o bien la secuencia heterocigota o bien la secuencia de delección homocigota con respecto a α_{2c} AR se denomina “portador de Del322-325” o “portador de delección”.

En cualquiera de estas circunstancias, el profesional médico “conoce” la información relevante que le permitirá determinar si el bucindolol es una opción medicamentosa apropiada. Se contempla que, por ejemplo, un laboratorio lleve a cabo la prueba para determinar el genotipo del paciente de manera que su personal también conozca la información apropiada. Pueden informar al profesional del resultado específico de la prueba realizada o el laboratorio puede simplemente notificar que el bucindolol es el fármaco apropiado basándose en los resultados de laboratorio.

En realizaciones adicionales, se conoce el genotipo del paciente en la posición de nucleótido 1165 de la secuencia codificante de uno o ambos alelos de β_1 AR. En el contexto de la presente invención, si la posición 1165 de la secuencia codificante contiene una guanina o citosina en uno o ambos alelos es significativo. Esto indica qué aminoácido puede encontrarse en la posición 389 de la secuencia de proteína de β_1 AR. Una citosina en la posición 1165 en la secuencia codificante codifica para una arginina, mientras que una guanina en la secuencia codificante codifica para una glicina. En realizaciones particulares, se conocen las secuencias en la posición 1165 en ambos alelos de β_1 AR del paciente. El resultado puede ser una guanina en ambos alelos, una citosina en ambos alelos o una guanina en uno alelo y una citosina en el otro alelo.

En ciertas realizaciones, se conoce el genotipo del paciente en las posiciones de nucleótido 964-975 de la secuencia codificante de uno o ambos alelos de α_{2c} AR. En el contexto de la presente invención, si hay una delección en uno o ambos alelos del gen de α_{2c} AR es significativo. Esto indica si hay una delección de un aminoácido de los aminoácidos 322-325 (aminoácidos 322, 323, 324 y 325) de la secuencia de proteína de α_{2c} AR. En realizaciones particulares, se conoce si hay una delección de la secuencia de nucleótidos correspondiente a las posiciones 964-975 en ambos alelos de β_1 AR del paciente.

Los expertos en la técnica entenderán fácilmente que la secuencia codificante de un gen se refiere a la cadena del gen que se usa para la transcripción del ARN mensajero. La secuencia de la secuencia codificante es complementaria a la secuencia del transcrito que se transcribe. Debido a la naturaleza complementaria de las secuencias entre una secuencia codificante y una secuencia no codificante, la secuencia de cualquier secuencia codificante puede determinarse conociendo la secuencia del transcrito, la cadena no codificante o la proteína codificada. La secuencia de ácido nucleico en esa posición en uno o ambos alelos puede determinarse mediante varios modos conocidos para los expertos en la técnica. Tales modos incluyen, pero no se limitan a, secuenciación por terminación de cadena, digestión por restricción, reacción de polimerasa específica de alelo, análisis de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla, análisis de fragmentos genéticos, electroforesis en gel en gradiente de temperatura o reacción en cadena de la ligasa.

Alternativamente, puede evaluarse la secuencia de proteína de β_1 AR. En ciertas realizaciones, se conoce el aminoácido en la posición 389 en una o más de las proteínas de β_1 AR del paciente. Se contempla que cualquier muestra evaluada del paciente contendrá múltiples proteínas de β_1 AR que pueden analizarse. Un análisis de estas proteínas puede determinar si el paciente tiene proteínas de β_1 AR con sólo una arginina en 389, sólo una glicina en 389 o una mezcla de ambos tipos. De manera similar, puede evaluarse la secuencia de proteína de α_{2c} AR. En realizaciones particulares, se conoce si hay una delección de los aminoácidos 322-325 en una o más de las proteínas de α_{2c} AR del paciente.

Se contempla que cualquier muestra evaluada del paciente contendrá múltiples proteínas de β_1 AR y α_{2c} AR que pueden analizarse. Un análisis de estas proteínas puede determinar si el paciente tiene proteínas de β_1 AR con sólo una arginina en 389, sólo una glicina en 389 o una mezcla de ambos tipos. Asimismo, puede determinarse si el paciente tiene proteínas de α_{2c} AR con sólo la secuencia de tipo natural en los aminoácidos 322-325 (sin delección), sólo una delección de los aminoácidos correspondientes a 322-325 o una mezcla de ambos tipos.

Los expertos en la técnica conocen bien los métodos para determinar la secuencia en una posición particular en una proteína. Pueden implicar usar un anticuerpo, cromatografía de líquidos de alta resolución o espectroscopía de masas.

Tal como se trató anteriormente, puede conocerse la secuencia de una posición particular en la proteína o gen β_1 AR y/o proteína o gen α_{2c} AR. Algunos métodos de la invención implican determinar la secuencia en la secuencia de proteína o gen β_1 AR y/o la secuencia de proteína o gen α_{2c} AR.

En consecuencia, se contempla que las realizaciones pueden implicar obtener una muestra biológica de un paciente. Una muestra biológica es una muestra que contiene material biológico tal como todo o parte de un órgano, tejido, células, ácidos nucleicos, proteínas u otras macromoléculas y sustancias de este tipo. La muestra puede incluir esputos, suero, sangre, plasma, líquido cefalorraquídeo, semen, líquido linfático, orina, heces, derrame pleural, ascitis, una muestra de tejido, biopsia de tejido, hisopo con células o una combinación de los mismos. En otras realizaciones de la invención, una muestra puede incluir células que provienen de pulmón, piel, músculo, hígado, riñón, colon, próstata, mama, cerebro, vejiga, intestino delgado, intestino grueso, cuello uterino, estómago, páncreas, testículos, ovarios, hueso, médula o columna vertebral. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre completa, plasma o suero, mientras que en otras realizaciones, la muestra se obtiene mediante lavado, frotis o frotamiento con hisopo de una zona externa o interna del paciente. En ciertas realizaciones, la muestra biológica es una muestra de sangre.

En algunas realizaciones de la invención, puede haberse evaluado ya la secuencia de proteínas y/o genes β_1 AR de un paciente y/o la secuencia de proteínas y/o genes α_{2c} AR de un paciente. Se contempla que este análisis puede haberse realizado antes de que el paciente se considere para el tratamiento con bucindolol o como parte de un examen general. Por ejemplo, la secuencia de las proteínas y/o genes β_1 AR del paciente, así como sus proteínas y/o genes α_{2c} AR puede determinarse e introducirse en una base de datos o introducirse en la historia médica del paciente. En este caso, un profesional médico puede llegar a conocer cuál es la secuencia obteniendo la historia de un paciente referente a la secuencia i) en la posición 1165 en la secuencia codificante de uno o ambos alelos de β_1 AR o ii) en la posición 389 en la secuencia de aminoácidos de la proteína de β_1 AR; iii) en la posición 964-975 en la secuencia codificante de uno o ambos alelos de α_{2c} AR; y/o iv) en las posiciones 322-325 en la secuencia de aminoácidos de la proteína de α_{2c} AR.

La presente invención también implica notificar los resultados de una determinación de la secuencia de proteína o ácido nucleico en la posición relevante en la proteína o los alelos de β_1 AR y/o la proteína o los alelos de α_{2c} AR. En ciertas realizaciones, los métodos incluyen preparar un informe que contiene los resultados de la determinación de (i), (ii), (iii) y/o (iv) descritos en el párrafo anterior. Un informe de este tipo identificará al paciente mediante el nombre, el número de la seguridad social y/u otro calificador o número de identificación. También puede contener los datos reales como resultado de la determinación o un resumen de esos datos.

En algunas realizaciones, los métodos incluyen identificar a un paciente que posiblemente necesita el tratamiento con un bucindolol. Un paciente para el que está considerándose el bucindolol como opción de tratamiento puede tener síntomas de o puede habersele diagnosticado un estado médico, tal como insuficiencia cardíaca, cardiomiopatía dilatada, cardiopatía isquémica, feocromocitoma, migrañas, arritmias cardíacas, hipertensión o un trastorno de ansiedad. En ciertas realizaciones, el paciente tiene síntomas de o se le ha diagnosticado cardiopatía isquémica, que puede ser específicamente angina y/o un infarto de miocardio. En casos particulares, un paciente tiene síntomas de o se le ha diagnosticado insuficiencia cardíaca. La insuficiencia cardíaca puede considerarse insuficiencia cardíaca avanzada, aunque la invención puede no limitarse a tales pacientes. La expresión “insuficiencia cardíaca avanzada” se usa

según su significado sencillo y normal en el campo de la cardiología. En algunas realizaciones, un paciente al que se le prescribe bucindolol puede tener insuficiencia cardíaca de clase III o clase IV según el sistema de clasificación de la NYHA. El sistema de clasificación de la NYHA es un sistema de evaluación, sin embargo, se contempla que la invención no se limite de este modo y que esto pretende ser ilustrativo en vez de limitativo. Los pacientes pueden clasificarse mediante otro sistema de este tipo. Se contempla además que los pacientes puedan clasificarse mediante una metodología diferente pero que la invención se implemente de manera similar.

Sin embargo, en otras realizaciones, un paciente puede tener signos o síntomas de insuficiencia cardíaca pero no insuficiencia cardíaca avanzada. En una situación de este tipo, el paciente puede haberse caracterizado o puede caracterizarse como paciente con insuficiencia cardíaca de clase I o II según el sistema de clasificación de la NYHA. En estas realizaciones, el paciente puede genotiparse para el polimorfismo Arg389 β_1 , en cuyo caso una persona con el fenotipo Arg/Arg es un candidato para el tratamiento con bucindolol. En consecuencia, los métodos de la invención pueden implicar prevenir la insuficiencia cardíaca en un paciente determinando si el paciente tiene el polimorfismo Arg389/Arg389 y administrando bucindolol si es así. Pacientes particulares podrían ser particularmente adecuados para esto incluyendo, pero sin limitarse a, los pacientes con síntomas de insuficiencia cardíaca, con factores de riesgo de insuficiencia cardíaca o con una historia anterior o familiar de insuficiencia cardíaca.

Adicionalmente, los métodos pueden implicar administrar o prescribir otros agentes terapéuticos o realizar una estrategia quirúrgica u otra estrategia de intervención para tratar al paciente.

Según la presente invención, los métodos pueden implicar adicionalmente prescribir o administrar bucindolol al paciente tras conocer que el genotipo del paciente en el polimorfismo 389 es Arg389/Arg389, también conocido como genotipo homocigoto para arginina. Adicional o alternativamente, puede prescribirse o administrarse bucindolol tras conocer que el paciente tiene el polimorfismo de α_{2c} AR de tipo natural homocigoto (no porta una delección de los nucleótidos 964-975 en cualquier alelo del gen α_{2c} AR). Además, puede ser el caso que un paciente que *no* presente cualquiera de o ambos genotipos no se le prescribirá o administrará bucindolol. Puede prescribirse o administrarse al paciente un β -bloqueante que específicamente no es bucindolol.

En realizaciones adicionales, los métodos pueden implicar conocer si hay una delección en (iii) la secuencia de nucleótidos en las posiciones 964-975 en la secuencia codificante de uno o ambos de los genes α_{2c} AR del paciente o (iv) la secuencia de aminoácidos en las posiciones 322-325 de una o más de las proteínas de α_{2c} AR del paciente. Esto puede conocerse además de o independientemente de cuál sea el genotipo del paciente en el gen β_1 AR en la posición 1165 (389 en la proteína).

Si un paciente con insuficiencia cardíaca avanzada (es decir, clase III o IV de la NYHA) presenta un genotipo Del322-325 para AR α_{2c} homocigoto y el paciente no presenta el genotipo Arg389/Arg389, se contempla que no se prescribirá o administrará bucindolol al paciente. En ciertas realizaciones, se identifica al paciente como paciente cuya raza es negra. Alternativamente, si un paciente no presenta un genotipo Del322-325 para α_{2c} AR homocigoto, puede prescribirse o administrarse bucindolol al paciente.

También puede considerarse otra información para determinar si el bucindolol es un fármaco apropiado para el paciente. Esto puede incluir la raza, el género, la edad, las intervenciones quirúrgicas anteriores, el estadio de la insuficiencia cardíaca, la historia del paciente referente a enfermedad cardiovascular, el diagnóstico de otras enfermedades o estados, los riesgos de otras enfermedades o estados, las alergias a fármacos, la toxicidad a fármacos y/u otros medicamentos que estén tomándose.

Por tanto, se contempla que la invención también se refiera a realizar un análisis de diplotipo u obtener los resultados de un análisis de diplotipo. En realizaciones particulares, el análisis de diplotipo implica evaluar directa o indirectamente el polimorfismo (1) en la posición 389 de β_1 AR de manera que se determine si un paciente tiene un genotipo Arg389/Arg389 y (2) en la posición 322-325 de α_{2c} AR de manera que se determine si el paciente tiene un genotipo Del322-325/Del322-325. Pueden incluirse otros polimorfismos en el haplotipo, particularmente los que se ven afectados o afectan a la capacidad del paciente para responder favorablemente a bucindolol como agente terapéutico.

Cualquier realización tratada con respecto a un aspecto de la invención también se aplica a otros aspectos de la invención. Esto incluye realizaciones tratadas con respecto a cada uno de β_1 AR y α_{2c} AR. Específicamente, cualquier realización tratada con respecto a proteína, alelos o genes β_1 AR puede implementarse con respecto a proteínas, alelos o genes α_{2c} AR, y viceversa.

Se entiende que las realizaciones en la sección de ejemplos son realizaciones de la invención que pueden aplicarse a todos los aspectos de la invención.

El uso del término “o” en las reivindicaciones se usa significando “y/o” a menos que se indique explícitamente para referirse a alternativas solamente o las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la descripción soporta una definición que se refiera a sólo alternativas e “y/o”.

En toda esta solicitud, el término “aproximadamente” se usa para indicar que un valor incluye la desviación estándar del error para el dispositivo o método que se emplea para determinar el valor.

Siguiendo la ley de patentes de larga tradición, las palabras “un” y “una”, cuando se usan conjuntamente con las palabras “que comprende” en las reivindicaciones o la memoria descriptiva, indican uno o más, a menos que se indique específicamente.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones específicas de la invención, se proporcionan a modo de ilustración solamente, puesto que diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor con referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

Figura 1. Se representan las estructuras químicas de varios β -bloqueantes, incluyendo bucindolol.

Figura 2. Cuadro comparativo de diferentes agentes antiadrenérgicos y tratamientos basados en datos de ensayos clínicos de fase II o III sobre insuficiencia cardíaca u otros datos de desarrollo.

Figura 3. Esta figura ilustra los efectos específicos de alelo de bucindolol en células que expresan de manera estable β_1 Arg389 o β_1 Gly389. Los resultados son la media $\pm$ DE de 4 experimentos.

Figura 4. El gráfico de barras ilustra una respuesta al bloqueo β en ratones transgénicos con sobreexpresión dirigida de β_1 AR con Gly389 y Arg389 en el corazón. Se muestran los resultados como media ($\pm$ DE) de las inmunotransferencias de tipo Western para las proteínas indicadas de corazones de ratones β_1 Arg389 y β_1 Gly389 ($n = 3-4$ en cada grupo). Los datos están normalizados para los valores control (no tratados). Se encontró una respuesta de tratamiento global a propranolol sólo en corazones de los ratones β_1 -Arg389 ($P < 0,002$ mediante ANOVA).

Figura 5. Ilustra las razones de riesgo y los intervalos de confianza del 95% para desenlaces de insuficiencia cardíaca estratificados por genotipo de β_1 AR.

Figura 6. Este gráfico ilustra la supervivencia de los pacientes en el estudio de bucindolol-placebo estratificada por tratamiento y genotipo de β_1 AR.

Figura 7. Este gráfico ilustra la probabilidad de alcanzar el criterio de valoración combinado de muerte u hospitalizaciones por insuficiencia cardíaca en el estudio de bucindolol-placebo estratificada por tratamiento y genotipo de β_1 AR.

Figura 8. Cambio desde los niveles de norepinefrina iniciales $\pm$ EEM a los 3 meses y 12 meses, por grupo de tratamiento. Tanto en A como en B, los números debajo de las barras son los números de pacientes en cada grupo que tuvieron mediciones iniciales y en intervalos en cada punto de tiempo; se proporcionan valores de p para una comparación del cambio en cada grupo de tratamiento.

Figura 9. Razones de riesgo en relación con el primer cuartil para la mortalidad por cualquier causa, por cuartil de norepinefrina inicial. Los puntos de corte de norepinefrina que definen los cuartiles son: 1°, ≤ 304 pg/ml; 2°, de 305 pg/ml a 436 pg/ml; 3°, de 437 pg/ml a 635 pg/ml; 4°, ≥ 636 pg/ml. Los números de pacientes por cuartil son: Grupo de placebo 1° 294, 2° 255, 3° 248, 4° 264; grupo de bucindolol 1° 239, 2° 274, 3° 284, 4° 267.

Figura 10. Razones de riesgo en relación con el primer cuartil para el criterio de valoración combinado de mortalidad por cualquier causa + hospitalización por ICC, por cuartil de norepinefrina inicial.

Figura 11. Análisis de probabilidad para el cambio en norepinefrina a los 3 meses frente a mortalidad por cualquier causa posterior, grupos de tratamiento con placebo y bucindolol.

Figura 12. Las respuestas contráctiles *ex vivo* de ventrículo humano con insuficiencia y sin insuficiencia se correlacionan con el genotipo de β_1 AR. Se utilizaron trabéculas de ventrículo derecho de corazones humanos con insuficiencia y sin insuficiencia tal como se describe en Métodos. Se estudiaron trabéculas de 11 corazones en cada uno de los cuatro grupos. Todas las bandas de Arg eran de sujetos homocigotos. Los portadores de Gly consistieron en 10 heterocigotos en el grupo sin insuficiencia y 9 en el grupo con insuficiencia, siendo el resto homocigotos para Gly. La respuesta máxima derivada de las curvas de dosis-respuesta era mayor para Arg389, tanto en los estudios sin insuficiencia ($P = 0,01$) como con insuficiencia ($P = 0,008$).

Figura 13A-D. Efecto de dosis crecientes de bucindolol o xamoterol sobre la fuerza sistólica pico (mN/mm²) en trabéculas de ventrículo derecho aisladas de corazones humanos con insuficiencia. Se realizaron las curvas de dosis-respuesta sin (bucindolol, panel A; xamoterol, panel C) y con (bucindolol, panel B; xamoterol, panel D) tratamien-

to previo mediante forskolina 10^{-5} M para potenciar la transducción de señales de β -AR. En los experimentos con tratamiento previo con forskolina, se dejaron incubar las trabéculas con forskolina sola durante todo el periodo de tratamiento, y cualquier efecto sobre la fuerza se restó de las trabéculas tratadas con bucindolol o xamoterol. *, = $p < 0,05$ frente a tensión inicial; †, $p < 0,10$ frente a tensión inicial; §, $p < 0,05$ frente a pendiente de 0 para toda la curva; ¶, $p < 0,05$ frente a pendiente de 0 para dosis de 10^{-9} M a 10^{-6} M; los valores de p asociados con corchetes son para someter a prueba la interacción entre las pendientes de las curvas, con el 1^{er} valor de p para dosis de entre 10^{-9} M y 10^{-6} M, y el 2^o valor de p para toda la curva.

Figura 14. Consecuencias antitéticas de la estimulación adrenérgica β_1 miocárdica crónica.

Figura 15. Características del cambio de norepinefrina en grupos de riesgo y pacientes tratados con bucindolol. Se incluyen las desviaciones estándar (DE) en la tabla.

Figura 16. Características adicionales del cambio de norepinefrina en grupos de riesgo y pacientes tratados con bucindolol. Se incluyen las desviaciones estándar (DE) en la tabla.

Figura 17. Ilustración de la correlación entre el genotipo de α_{2c} AR y los niveles de norepinefrina sistémica en pacientes de BEST.

Figura 18. Ilustración de la correlación entre el genotipo de α_{2c} AR y la respuesta de norepinefrina sistémica ($pg \pm EEM$) en pacientes de BEST después de tres meses.

Figura 19. Correlaciones entre el genotipo de α_{2c} AR, la respuesta de norepinefrina sistémica ($pg \pm EEM$) en pacientes de BEST después de tres meses y la supervivencia por grupo de tratamiento entre pacientes de BEST.

Figura 20A-D. Efecto de las variantes génicas Arg/Gly 389 de β_1 AR sobre la respuesta a isoproterenol en trabéculas de VD humano aisladas. A. Respuesta a Iso con insuficiencia de β_1 -AR Arg 389 homocigoto. B. Respuesta a Iso con insuficiencia de portador de β_1 -AR Gly 389. C. Respuesta a Iso sin insuficiencia de β_1 -AR Arg 389 homocigoto. D. Respuesta a Iso sin insuficiencia de portador de β_1 -AR Gly 389.

Figura 21. Variantes génicas de β_1 -AR y α_{2c} AR: efectos del tratamiento en BEST (mortalidad).

Figura 22. Ensayos de mortalidad con β -bloqueantes en poblaciones estadounidenses, razones de riesgo-mortalidad $\pm$ I.C. del 95%.

Figura 23. Efecto de agentes de β -bloqueantes sobre la función sistólica en trabéculas de VDh SI (sin insuficiencia).

Figura 24. Efecto de agentes β -bloqueantes sobre la función sistólica en trabéculas de VDh SI con amplificación de la transducción de señales mediante tratamiento con forskolina $10 \mu M$ (F).

Figura 25. Efecto de agentes de β -bloqueantes sobre la función sistólica en trabéculas de VDh con insuficiencia.

Figura 26. Efecto de agentes β -bloqueantes sobre la función sistólica en trabéculas de VDh con insuficiencia con amplificación de la transducción de señales mediante tratamiento con forskolina $10 \mu M$ (F).

Figura 27. Diseño I del estudio.

Figura 28. Diseño II del estudio.

Figura 29. Diseño III del estudio.

Descripción de realizaciones ilustrativas

Los inventores de la presente invención se enfrentaron a los datos de que el bucindolol parecía proporcionar respuestas terapéuticas menos favorables en ciertos subgrupos de pacientes y una respuesta menos favorable que otros β -bloqueantes mediante ciertos criterios. Propusieron la hipótesis de que la variabilidad entre individuos en la respuesta a bucindolol en la insuficiencia cardíaca (IC) se debe a la variabilidad genética y determinaron la base para la misma. Al hacer esto, los inventores pudieron elaborar un caso significativo para el valor terapéutico del bucindolol y su idoneidad para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca en seres humanos.

Se evaluó la variabilidad genética del β_1 AR en el aminoácido 389 de la proteína (ácido nucleico 1165 del gen). Esto se basó en las propiedades de los dos receptores, indicados en el presente documento como Arg389 y Gly389, según se determinó en células transfectadas, en las que las actividades adenilil ciclase estimulada por agonista y basal son aproximadamente 3 veces mayores para el receptor con Arg (Mason *et al.*, 1999). Sin embargo, antes de los actuales estudios, no estaba claro si los pacientes con Arg389, o Gly389, se beneficiarían más del tratamiento con bucindolol. Por ejemplo, la función potenciada de Arg389 puede haber hecho imposible que el bucindolol actúe como antagonista eficaz. No se llevó a cabo la última prueba de la hipótesis, en la que se evaluaban la muerte, el trasplante cardíaco

o las hospitalizaciones por IC (exacerbaciones de la insuficiencia cardíaca en un paciente real tratado con placebo o bucindolol).

Por tanto, la presente invención abordó la cuestión de si el alelo de β_1 AR con Arg (o Gly) 389 representa un locus farmacogenético para predecir la respuesta a β -bloqueantes en la insuficiencia cardíaca usando un enfoque de tres niveles que implicaba investigaciones en células transfectadas (véase el ejemplo 1 tratado en detalle a continuación), ratones transgénicos (véase el ejemplo 2 tratado en detalle a continuación) y un ensayo clínico controlado con placebo multicéntrico grande (véase el ejemplo 3 tratado en detalle a continuación). El estudio clínico se denomina BEST (ensayo de evaluación de la supervivencia de betabloqueantes (*Beta Blocker Evaluation of Survival Trial*)). En las células transfectadas, se evaluó el antagonismo funcional por bucindolol del AMPc estimulado por norepinefrina. Aún cuando el receptor Arg389 mostró una producción de AMPc estimulada por norepinefrina marcadamente superior, el bucindolol antagonizó la respuesta. La disminución absoluta en la producción de AMPc era sustancialmente mayor para células que expresaban Arg389 frente a Gly389, lo que se debe a la alta estimulación por norepinefrina de Arg389 y a la eficacia del bucindolol para antagonizar completamente la respuesta. Se observó una inhibición de aproximadamente el 80% de la respuesta de AMPc por Arg389 en bucindolol 0,1 μ M, lo que es comparable a las concentraciones plasmáticas del fármaco a las dosis usadas en BEST (datos no publicados). Estos resultados sugerían que podría ser posible un mayor cambio en la actividad de β_1 AR cardíaca a partir del tratamiento con bucindolol en aquellos pacientes con el genotipo β_1 -Arg389 en comparación con el β_1 -Gly389, y potencialmente dar como resultado una respuesta clínica más favorable. En los estudios con ratones transgénicos, los inventores examinaron el efecto del bloqueo β a lo largo de un periodo de 6 meses sobre la expresión de proteínas de manejo de Ca^{2+} y señalización claves en el corazón. Con los ratones con Gly389, no hubo ningún efecto del tratamiento sobre la expresión de estas proteínas. Por otro lado, se observó un efecto global del tratamiento a partir del bloqueo β en los ratones con Arg389, con cambios que son consecuentes con la remodelación inversa a nivel molecular. A continuación, se utilizó el ADN archivado de BEST, un estudio que proporcionó un grupo placebo emparejado y fenotipado extenso; debido a los resultados en las células transfectadas y los ratones transgénicos, los inventores tenían la hipótesis *a priori* de que β_1 -Arg389 sería el genotipo más favorable para la supervivencia. En este caso, se suponía un modelo dominante. Por tanto, los dos grupos de genotipo eran homocigotos para Arg389 y pacientes con uno o dos alelos con Gly389 (es decir, homocigoto para Gly o heterocigotos; este grupo se denomina “portadores de Gly389”). Los resultados de los criterios de valoración clínicos de BEST indican que no hay beneficio de mortalidad, hospitalización por insuficiencia cardíaca o mortalidad + hospitalización por insuficiencia cardíaca del tratamiento con bucindolol en pacientes que son portadores de β_1 -Gly389, pero sí mejoras clínicamente relevantes en los tres desenlaces en pacientes homocigotos para β_1 -Arg389 tratados con bucindolol en comparación con placebo. Los parámetros clínicos iniciales incluyendo la frecuencia cardíaca, tensión arterial y FEVI, o la etiología de la insuficiencia cardíaca, no eran predictivos de la respuesta a los criterios de valoración en la cohorte entera que incluía todas las variantes génicas de β_1 AR. Además, no hubo ningún efecto evidente del polimorfismo β_1 -Gly49 sobre estas relaciones. En conjunto, los resultados de estos estudios sugieren entonces fuertemente que la variante en la posición 389 de β_1 AR es un factor de pronóstico de la respuesta a bucindolol en la insuficiencia cardíaca.

Además, también se propuso un papel para la variante genética en el gen α_{2c} AR en la eficacia del bucindolol. Los inventores de la presente invención propusieron la hipótesis de que la variabilidad entre individuos en la respuesta a bucindolol en la insuficiencia cardíaca se debe a la variabilidad genética del gen α_{2c} AR. Por tanto, la presente invención abordó la pregunta de si el alelo α_{2c} Del322-325 AR representa un locus farmacogenético para predecir la respuesta a bucindolol en la insuficiencia cardíaca usando BEST, un ensayo controlado con placebo multicéntrico grande (véanse los ejemplos tratados en detalle a continuación). Se utilizó el ADN archivado de BEST, un estudio que proporcionó un grupo placebo emparejado y fenotipado extenso. En este caso, se suponía un modelo dominante. Por tanto, los dos grupos de genotipo fueron 1) homocigotos para α_{2c} de tipo natural (pacientes sin delección en 322-325 en cualquier alelo) y homocigotos o heterocigotos para α_{2c} Del322-325 (pacientes con la delección en uno o ambos alelos, denominados “portadores de α_{2c} Del322-325”). Los resultados de los criterios de valoración clínicos de BEST indican que no hay beneficio de mortalidad, hospitalización por insuficiencia cardíaca o mortalidad más hospitalización por insuficiencia cardíaca del tratamiento con bucindolol en pacientes que son portadores de α_{2c} Del322-325, pero sí mejoras clínicamente relevantes en los tres desenlaces en pacientes homocigotos para α_{2c} de tipo natural tratados con bucindolol en comparación con placebo. Los parámetros clínicos iniciales incluyendo la frecuencia cardíaca, tensión arterial y FEVI, o la etiología de la insuficiencia cardíaca, no eran predictivos de respuesta a los criterios de valoración en toda la cohorte que incluía todas las variantes génicas de α_{2c} AR. En conjunto, los resultados a partir de estos estudios sugieren entonces fuertemente que el polimorfismo α_{2c} Del322-325 es un factor de pronóstico de la respuesta a bucindolol en la insuficiencia cardíaca.

Por tanto, la presente invención se refiere a métodos que utilizan la relación genética entre el polimorfismo Arg389 de β_1 AR y la terapia con bucindolol y entre el polimorfismo Del322-325 de α_{2c} AR y la terapia con bucindolol.

I. Receptores adrenérgicos y β -Bloqueantes

El tratamiento para la insuficiencia cardíaca ha implicado la selección como diana de los receptores adrenérgicos (AR). Existen al menos nueve subtipos de receptores adrenérgicos (Dohlgan *et al.*, 1991; y Liggett *et al.*, 1993), de los que al menos tres subtipos son receptores β -adrenérgicos.

Un papel potencial de las variantes genéticas comunes en la susceptibilidad, evolución y respuesta al tratamiento se sugiere mediante el agrupamiento familiar de fenotipos, la penetración reducida en cardiomiopatías familiares y

las marcadas variaciones entre individuos en los desenlaces de evolución y tratamiento. Aunque se han identificado polimorfismos en receptores adrenérgicos, no ha habido ningún estudio que implique datos de pacientes en los que se haya identificado una correlación entre cualquier polimorfismo y una respuesta clínica a un agente terapéutico. La presente invención se refiere a dos polimorfismos: 1) el polimorfismo que codifica para el aminoácido en la posición 389 en β_1 -AR y 2) el polimorfismo que codifica para los aminoácidos 322-325 en α_2c -AR. Sin embargo, no se ha establecido la relación entre esta variante genética particular y cualquier desenlace del tratamiento con ninguna prueba clínica antes de la presente invención, ni se ha demostrado ninguna correlación con bucindolol.

A. Receptor adrenérgico β_1

El receptor adrenérgico β_1 (β_1 -AR) es el principal subtipo expresado en los cardiomiocitos. El corazón humano expresa los subtipos tanto β_1 AR como β_2 AR (Bristow *et al.*, 1986; Bristow *et al.*, 1988). Cada receptor media respuestas cronotrópicas e inotrópicas positivas a las catecolaminas endógenas y los agonistas administrados exógenamente (Bristow *et al.*, 1986; Brodde *et al.*, 1986; Brodde *et al.*, 1992).

El β_1 AR desencadena la respuesta contráctil del corazón cuando se activa, tal como mediante norepinefrina. Además, el receptor β_1 tiene un papel central en la evolución de la cardiomiopatía y otras rutas patológicas. El aumento de la activación de este receptor y sus rutas arrítmicas y miopáticas asociadas desempeña un papel importante en la historia natural de la insuficiencia cardíaca. Una vez que ha comenzado el proceso cardiomiopático, la activación β_1 -adrenérgica crónica acelera la evolución de la enfermedad, a medida que el corazón con insuficiencia trata de compensar su funcionamiento deteriorado liberando más norepinefrina y aumentando la señalización mediante el receptor β_1 . La teoría de bloqueo del receptor β se base en parte en contrarrestar esta ruta cardiomiopática bloqueando el receptor β_1 y reduciendo la señalización por norepinefrina.

Se ha clonado y secuenciado el receptor adrenérgico β_1 (Frielle *et al.*, 1987). Se ha localizado el gen en el cromosoma q24-q26 del cromosoma 10 (Yang-Feng *et al.*, 1990). El β_1 AR humano tiene una secuencia de aminoácidos deducida de 477 aminoácidos.

En la posición de nucleótido codificante 1165 del gen β_1 AR, puede encontrarse o bien citosina o bien guanina en la población humana, lo que da como resultado que se codifique para o bien Arg o bien Gly en la posición de aminoácido 389 (Mason *et al.*, 1999). Esta posición está dentro de un dominio intracelular del receptor que está implicado en el acoplamiento a la proteína G estimulante, G_s . En fibroblastos transfectados para expresar niveles iguales de los dos receptores, el receptor β_1 -Arg389 muestra sustancialmente mayor estimulación de la adenilil ciclase en comparación con β_1 -Gly389 (Mason *et al.*, 1999). También se ha identificado un polimorfismo menos común del β_1 AR, Gly49, pero existen informes discrepantes en cuanto a sus implicaciones funcionales (Rathz *et al.*, 2002; y Levin *et al.*, 2002).

El polimorfismo Arg/Arg389 de β_1 -AR, en realidad, es la forma más prevalente del receptor adrenérgico β_1 y está presente en aproximadamente el 50% de la población estadounidense (ligeramente menos en afroamericanos). La otra variante de este receptor tiene una glicina (Gly) en la posición 389 y se considera el tipo natural sólo porque se clonó primero. La presencia de una arginina (Arg) en el codón 389 es la estructura preferida (y única) de este receptor en todas las otras especies de animales no humanos conocidas, y la región 389 está en un dominio funcional importante. La Arg/Arg389 es también la mayor variación de funcionamiento de este receptor (Mason *et al.*, 1999); su eficacia de transducción de señales es 3-4 veces mayor que para los heterocigotos para Gly o Gly/Gly en la posición 389 (véanse los ejemplos y Mason *et al.*, 1999). El aumento de la capacidad de transducción de señales del Arg/Arg389 de β_1 -AR se aplica a la generación de AMPc (Mason *et al.*, 1999), a la contracción del músculo cardíaco humano aislado (Mason *et al.*, 1999) y a la producción de cardiomiopatía en ratones transgénicos (Mialet Perez *et al.*, 2003).

Se han evaluado ciertos β -bloqueantes en el contexto de variaciones genéticas específicas con resultados variables. Sofowora *et al.* notificaron que los pacientes que son homocigotos para Gly389 son menos sensibles a los efectos de atenolol, un receptor β -adrenérgico selectivo, basándose en respuestas hemodinámicas, lo que sugiere a los autores que la variación puede ser particularmente relevante para las respuestas de tensión arterial en reposo. Johnson *et al.* (1993) notificaron que era más probable que los homocigotos para Arg389 respondieran a metoprolol, un β -bloqueante selectivo, tal como se midió mediante la tensión arterial. Perez *et al.* (2003) evaluaron variantes en la posición 389 del β_1 AR en el contexto de una función cardíaca intacta usando transgénesis dirigida en ratones. En estos ratones transgénicos que sobreexpresaban o bien Arg o bien Gly homocigota en la posición 389, los ratones Arg/Arg tuvieron una mayor pérdida de capacidad de respuesta a isoproterenol para los aumentos en la función miocárdica, y un mayor grado de cardiomiopatía tal como se midió mediante la disfunción miocárdica, el grado de remodelación de la cámara y la histología. También se notificó una mayor mejora en la función ventricular izquierda en pacientes tratados con carvedilol, un β -bloqueante no selectivo, que estaba asociada con el polimorfismo Arg389, en el estado o bien homocigoto o bien heterocigoto.

Liu *et al.* (2003) notifican que el hallazgo de una mayor respuesta (en términos de cambios en la frecuencia cardíaca) a metoprolol estaba asociado con Arg389 en comparación con Gly389. Los autores también advirtieron sobre extender los resultados más allá de su conjunto de pacientes, que eran voluntarios chinos, hombres, jóvenes, sanos. Dicen específicamente que el estudio no buscaba ningún efecto a largo plazo de metoprolol con respecto a los polimorfismos.

Un artículo de revisión publicado en 2004 (Lohse, 2004) observó que aunque el polimorfismo Arg389 podía ser relevante para el beneficio del tratamiento de β -bloqueantes, no había existido ningún estudio referente a la influencia de los polimorfismos del receptor adrenérgico β_1 sobre la capacidad de respuesta a β -bloqueantes en la insuficiencia cardíaca. Otra revisión indicó que aunque algunos estudios sugerían que los polimorfismos en los receptores adrenérgicos podrían alterar la respuesta al tratamiento con β -bloqueantes, no pudieron hacerse recomendaciones o conclusiones firmes para la gestión de los pacientes debido al bajo número de pacientes en los diferentes estudios.

Además, varios informes no detectaron ninguna correlación entre un polimorfismo en 389 del β_1 -AR y la respuesta al tratamiento con un β -bloqueante. Por tanto, existe un punto distintivo con respecto a la presente descripción, aunque la memoria descriptiva señala a una referencia de White *et al.* (véase el argumento n.º 1 a continuación), que supuestamente consideraba pacientes con insuficiencia cardíaca tratados con metoprolol tal como se evaluó mediante la mortalidad o el criterio de valoración combinado de mortalidad + hospitalización por insuficiencia cardíaca, y no encontraron ninguna asociación. O'Shaughnessy *et al.* (2000) notificaron que no se observaron diferencias en la respuesta de frecuencia cardíaca o tensión arterial al bloqueo beta (atenolol o bisoprolol, ambos antagonistas) debido al polimorfismo 389. Otro artículo, Joseph *et al.* (2004), tampoco observó ninguna diferencia en la afinidad del receptor por los β -bloqueantes con el polimorfismo 389. Además, un estudio reciente notificó que no pudo encontrarse ninguna prueba de “un efecto farmacogenético” sobre el tratamiento con metoprolol con respecto al polimorfismo Arg389. White *et al.*, *Eur. J. Heart Fail.* 5:463-8, 2003.

Por tanto, no se ha establecido una correlación entre la eficacia de los β -bloqueantes como una clase de agentes terapéuticos y el polimorfismo 389 en β_1 -AR. Además, no pudo realizarse ninguna correlación referente a bucindolol en particular, que difiere de los otros β -bloqueantes en varios aspectos importantes. Debido a que las diferencias entre los diversos β -bloqueantes es significativa, los efectos de las variantes de β_1 AR-389 sobre la respuesta a β -bloqueantes pueden depender del agente específico.

La presente descripción proporciona datos de que cuando los datos de BEST se evalúan en el contexto del genotipo individual, particularmente en el polimorfismo Arg389, el bucindolol tiene una eficacia terapéutica sustancial. Estos datos son sorprendentes dado que en el estudio BEST los efectos de mortalidad observados en la población total estudiada eran inferiores a los que se habían observado con otros β -bloqueantes tales como carvedilol, metoprolol CR/XL y bisoprolol. Además, los datos científicos proporcionados en el presente documento demuestran por primera vez una correlación entre la eficacia terapéutica del bucindolol y dos variantes genéticas.

En detalle, la invención proporciona un método para determinar si debe prescribirse bucindolol a un paciente en el que; se determina la identidad de un sitio de aminoácido o nucleótido polimórfico de un β_1 AR y un α_{2c} -AR y basándose en los resultados de esa prueba de diagnóstico o bien se prescribe bucindolol o bien no. De manera similar, basándose en el genotipo, puede prescribirse otro medicamento para el paciente con el genotipo de β_1 AR desfavorable, de manera que se intente obtener una respuesta clínica mejorada. En ambos escenarios, las decisiones del tratamiento farmacológico se basan en el genotipo de β_1 AR del paciente.

Por tanto, la invención se refiere a métodos para evaluar la terapia con bucindolol para un paciente, particularmente un paciente con insuficiencia cardíaca, basándose en si el individuo es homocigoto para Arg389 en el gen β_1 AR, homocigoto para la forma de tipo natural del α_{2c} AR en la posición de aminoácido 322-325, o ambos. Alternativamente, la presente invención se refiere a un método que se refiere al diplotipo de portador de β_1 ARGly389 y portador de α_{2c} ARDel322-325.

B. Receptor adrenérgico α_{2c}

Los α_{2c} -AR se ubican en las terminaciones nerviosas simpáticas cardíacas, y regulan la liberación neuronal pre-sináptica de norepinefrina a la zona de la hendidura sináptica. La unión de la norepinefrina a α_{2c} -AR provoca una respuesta simpaticolítica de realimentación negativa que atenúa la liberación de norepinefrina neuronal adicional. Los modelos de ablación de genes murinos implican a los α_{2c} -AR como los principales responsables de controlar la velocidad estacionaria crónica de la liberación de norepinefrina. (Hein *et al.*, 1999). En este sentido, el α_{2c} -AR tiene un papel “protector” en el corazón, amortiguando los niveles crónicamente elevados de norepinefrina que se encuentran en el corazón humano con insuficiencia.

Se ha notificado un polimorfismo genético humano para el gen α_{2c} -AR, ADRA2C. (Small *et al.*, 2000). Una pérdida de 12 nucleótidos en ADRA2C se traduce en una delección de cuatro aminoácidos consecutivos (α_{2c} Del322-325) en el tercer bucle intracelular del receptor. (Small *et al.*, 2000). Este polimorfismo de delección es mucho más común en afroamericanos, con una frecuencia alélica de 0,4 en comparación con 0,04 en sujetos no afroamericanos. Globalmente, este polimorfismo está presente en aproximadamente el 15% de la población estadounidense.

En contraposición al polimorfismo Arg389, el polimorfismo 322-325 Del del receptor adrenérgico α_{2c} es una variación de bajo funcionamiento y poco común de este receptor (Small *et al.*, 2000). La pérdida de estos cuatro residuos predice una reducción en la función del receptor, lo que está apoyado por experimentos de transfección celular en los que la función del receptor está reducida en un 50-85%. (Small *et al.*, 2000). Normalmente, el receptor α_{2c} inhibe tónicamente la liberación de norepinefrina presinápticamente en las terminaciones nerviosas adrenérgicas (Hein *et al.*, 1999).

La delección de 322-325 destruye esencialmente la función del receptor (Small *et al.*, 2000) conduciendo a niveles superiores de norepinefrina e impulso adrenérgico (Neumister *et al.*, 2005). La consecuencia de la disminución del control inhibitorio es que la liberación de norepinefrina basal aumenta constitutivamente dando como resultado un estado superior de actividad simpática. (Hein *et al.*, 1999). En la insuficiencia cardíaca esto es de particular interés ya que los receptores α_{2c} Del322-325 carecen del efecto de frenado “protector” frente al aumento del impulso simpático.

El polimorfismo del receptor α_{2c} Del322-325, presente en un estudio como genotipo homocigoto en sólo el 7,4% de los sujetos caucásicos pero en el 52,6% de los sujetos negros con insuficiencia cardíaca crónica, da como resultado una pérdida de la función tal como se evaluó mediante la inhibición de la estimulación de la adenilil ciclasa (Small *et al.*, 2002). Este defecto tiene consecuencias funcionales sobre la función de α_{2c} -AR y se ha denominado de manera intercambiable tanto “polimorfismo” como “mutación” reflejando las características de frecuencia relativa en las poblaciones y sus efectos estructurales/funcionales profundos, respectivamente. En toda esta propuesta la variante se denomina principalmente “polimorfismo” para reflejar que ésta es una variante común presente en muchos sujetos con insuficiencia cardíaca. Sin embargo, su importancia proviene de sus consecuencias funcionales, que reducen profundamente la actividad del receptor. Basándose en los efectos de la ablación genética en ratones, el receptor α_{2c} completamente funcional, de tipo natural es presinápticamente inhibitorio para la liberación de norepinefrina; ya que los ratones deficientes muestran una pérdida de esta inhibición que conduce a niveles de norepinefrina aumentados e hipertrofia patológica. (Hein *et al.*, 1999). La importancia clínica en seres humanos de este polimorfismo se ilustró en un estudio que identificó el genotipo α_{2c} Del322-325 como factor de riesgo para la insuficiencia cardíaca; teniendo una razón de probabilidades no ajustada para la insuficiencia cardíaca de 5,54 (IC del 95% 2,68, 11,45; $p < 0,001$) en sujetos negros homocigotos para este genotipo en comparación con heterocigotos y no portadores. (Small *et al.*, 2002). Conjuntamente con la variante de β_1 Arg389, el efecto era más pronunciado con una razón de probabilidades no ajustada de 12,67 (IC del 95% 2,70, 59,42; $p = 0,001$). Sin embargo, en contraposición con la presente descripción, no ha habido ninguna indicación de que estos polimorfismos sean relevantes desde una perspectiva terapéutica.

C. β -Bloqueantes

Mientras que se usan agonistas β_1 tales como dobutamina para tratar un deterioro agudo de pacientes con función ventricular con insuficiencia, la exposición prolongada del corazón a los agonistas administrados, o la elevada cantidad de agonistas de catecolaminas endógenos producidos por el cuerpo, conduce al empeoramiento de la insuficiencia cardíaca. De hecho, β_1 AR y β_2 AR se desensibilizan en la insuficiencia cardíaca, lo que se cree que es un mecanismo de autoprotección frente a los altos niveles de catecolaminas que existen en la insuficiencia cardíaca. La administración de antagonistas β puede mejorar la función ventricular y los desenlaces clínicos, presumiblemente bloqueando estos efectos perjudiciales de las catecolaminas. Y de hecho, la función y expresión cardíacas de β AR mejoran durante el tratamiento mediante bloqueo β de la insuficiencia cardíaca. La gran mayoría de los efectos perjudiciales de las catecolaminas, y el éxito de la terapia con β -bloqueantes se debe a variantes del subtipo de β_1 AR. (Zhu *et al.*, 2001; y Bristow *et al.*, 2003).

Los antagonistas de receptores β -adrenérgicos (también denominados β -bloqueantes) han surgido como una modalidad de tratamiento principal en la insuficiencia cardíaca crónica. Inicialmente, se creía que estos agentes estaban contraindicados en la insuficiencia cardíaca, dado que se creía que el aumento de impulso adrenérgico era crítico para dar soporte al corazón con insuficiencia. De hecho, en las primeras experiencias con el compuesto de 1ª generación propranolol, la administración de dosis convencionales estaba asociada frecuentemente con empeoramiento de la insuficiencia cardíaca (Stephen, 1968). Sin embargo, con el uso de dosis de partida bajas y un ajuste ascendente de la dosis lento, se ha demostrado que los compuestos de 2ª generación (bloqueantes β_1 selectivos) o 3ª generación (vasodilatadores- β -bloqueantes no selectivos) reversion la disfunción contráctil así como la remodelación molecular y estructural, y mejoran la morbilidad y mortalidad por insuficiencia cardíaca (Bristow, 2000); CIBIS-II Investigators and Committees. The cardiac insufficiency bisoprolol study II: a (CIBIS-II, 1999); MERIT-HF Study Group. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomized Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF, 1999). Packer *et al.* (2001); BEST Trial Investigators, (2001); Lowes *et al.*, 2002). En parte, se cree que estos efectos beneficiosos se deben a una protección del corazón con insuficiencia, que tiene reservas fisiológicas y metabólicas limitadas, frente a los efectos biológicos adversos persistentes mediados por los niveles de norepinefrina elevados encontrados en el síndrome (Bristow, 2000; Cohn *et al.*, 1984; y Liggett, 2001). Además, se ha demostrado que los β -bloqueantes reversion parcialmente el fenotipo molecular de la insuficiencia cardíaca (Lowes *et al.*, 2002), de modo que estos agentes pueden tanto prevenir como revertir la remodelación e insuficiencia miocárdica progresiva (Eichhorn y Bristow, Circulation 1996).

De manera interesante, estudios recientes han demostrado que la respuesta de tensión arterial y/o frecuencia cardíaca a los β -bloqueantes metoprolol y atenolol es mayor en individuos con Arg389 normotensos en comparación con individuos con Gly389 (Liu *et al.*, 2003; y Sofowora *et al.*, 2003). Y, en hipertensos, la respuesta de tensión arterial a metoprolol es mayor en pacientes con Arg389 en comparación con pacientes con Gly389 (Johnson *et al.*, 2003). Un estudio publicado sobre la insuficiencia cardíaca no ha encontrado ninguna tendencia o asociación evidente entre los polimorfismos de β_1 AR y la respuesta combinada de hospitalizaciones y muerte al tratamiento con metoprolol (White *et al.*, 2003). Sin embargo, en este estudio no se compararon directamente pacientes tratados con metoprolol con pacientes con placebo por genotipo, y aproximadamente el 45% de los pacientes tenía insuficiencia cardíaca leve (Clase II de la NYHA) y el periodo de seguimiento medio fue sólo de 12 meses. Tales diferencias pueden explicar esta discrepancia de potencial. Sin embargo, el bucindolol y metoprolol tienen algunas diferencias notables en sus pro-

iedades farmacológicas (Bristow, 2000; y Bristow *et al.*, 1997). En particular, el bucindolol reduce la norepinefrina, dilata la vasculatura periférica y bloquea de manera más potente el receptor adrenérgico β_1 humano.

Aunque una propiedad farmacológica común de todos los agentes β -bloqueantes que se han usado para tratar la IC es que bloquean el β_1 AR, que se ha estimado que en el corazón humano con insuficiencia transduce hasta aproximadamente el 90% de la estimulación adrenérgica patológica (Zhu *et al.*, 2001; y Bristow *et al.*, 2003), los β -bloqueantes disponibles tienen una serie de propiedades distintivas incluyendo selectividad por el subtipo de β AR, afinidad por α_1 AR, actividad agonista parcial, simpaticolisis (Bristow *et al.*, 2004) y vasodilatación (Bristow, 2000; y Bristow *et al.*, 1997).

La estructura química de algunos β -bloqueantes se facilita en la figura 1, que muestra que estos agentes tienen diferencias estructurales significativas. Además, tienen propiedades farmacológicas diferentes. Tal como se muestra en la figura 2, una comparación de diferentes agentes antiadrenérgicos en desarrollo o en ensayos clínicos de fase II o III representa estas diferencias. Por ejemplo, el carvedilol es un bloqueante de β_1 -AR y β_2 -AR eficaz, así como un bloqueante de α_1 -AR. En cambio, el bucindolol es un bloqueante de α_1 -AR débil, y el metoprolol y bisoprolol no bloquean el α_1 -AR en absoluto. De manera significativa, el bucindolol es único entre los β -bloqueantes por sus propiedades simpaticolíticas, en contraposición a carvedilol, metoprolol y bisoprolol, que no tienen tales propiedades. En comparación con otros agentes β -bloqueantes, el bucindolol reduce únicamente los niveles de norepinefrina sistémicos (Lowes *et al.*, 2000; Bristow *et al.*, 1997; BEST NEJM, Bristow, 2004), y es un agonista completo del receptor adrenérgico β_3 (Strosberg, 1997).

El bucindolol es un vasodilatador- β -bloqueante de 3ª generación con la estructura y el nombre químicos de (clorhidrato de 2-{2-hidroxi-3-{{2-(3-indolil)-1,1-dimetiletil}amino}-propoxi}-benzonitrilo). Se desarrolló por primera vez para la hipertensión y después para la insuficiencia cardíaca. Debido a sus propiedades vasodilatadoras y de agonista inverso bajas, los pacientes con insuficiencia cardíaca toleran relativamente bien el bloqueo β no selectivo de bucindolol, y en parte por este motivo en 1994 el Grupo de Ensayos Clínicos Cooperativos de la VA y el NIH seleccionaron el bucindolol para someter a prueba la hipótesis de que un β -bloqueante podría reducir la mortalidad en la insuficiencia cardíaca avanzada. La prueba de esta hipótesis fue el ensayo BEST, que se llevó a cabo entre el 31 de mayo de 1995 y el 29 de julio de 1999.

El Ensayo de la Evaluación de la Supervivencia de Betabloqueantes (“BEST”) se detuvo prematuramente por recomendación del Comité de Monitorización de Seguridad y Datos, en el momento en el que la razón de riesgo para el criterio de valoración primario de mortalidad por cualquier causa era de 0,90 (I.C. 0,78-1,02) (BEST Investigators, 2001; Domanski *et al.*, 2003). Sin embargo, los resultados para la cohorte entera de BEST fueron positivos para el criterio de valoración secundario de alto orden de mortalidad u hospitalización por insuficiencia cardíaca, que el bucindolol redujo en un 19% con un valor de p de $<0,0001$ (Domanski *et al.*, 2003). Este criterio de valoración, de hecho, se considera cada vez más como el criterio de valoración primario preferido para los ensayos centrales de IC.

Los motivos por los que se detuvo BEST fueron 1) confirmación por los datos del ensayo BEST generados en pacientes no negros, de clase III de la información entonces recientemente publicada de los ensayos CIBIS-II (CIBIS Investigators, 1999) y MERIT-HF (MERIT-HF Study Group, 1999) de que este tipo de pacientes con insuficiencia cardíaca tienen un beneficio de supervivencia sustancial del bloqueo β , 2) pérdida creciente de equiponderación entre los investigadores, quienes creían que se había demostrado la eficacia del bloqueo β en la insuficiencia cardíaca y 3) ineficacia y tendencias hacia acontecimientos adversos en subgrupos (clase IV y sujetos negros) que no se habían investigado anteriormente en ensayos de insuficiencia cardíaca con β -bloqueantes. Entonces, se abandonó el desarrollo adicional del bucindolol debido a que no estaba claro que el bucindolol pudiera comercializarse satisfactoriamente, incluso si se aprobase.

Por tanto, en este ensayo de supervivencia grande en el que la evaluación del criterio de valoración era la supervivencia global, se terminó con anticipación el ensayo clínico BEST debido a la confirmación del beneficio que se había demostrado recientemente en otros ensayos, y la incapacidad para extender la eficacia del bucindolol a subgrupos de pacientes que no se habían evaluado anteriormente en ensayos clínicos a gran escala (BEST Investigators, 2001). En ese momento, no existía ninguna diferencia significativa en la mortalidad observada entre los tratados con bucindolol o con un placebo. En claro contraste con los resultados de BEST, estudios similares con los antagonistas β -adrenérgicos bisoprolol (denominado ensayo “CIBIS-II”), metoprolol (denominado ensayo “MERIT-HF”) y carvedilol (denominado ensayo “COPERNICUS”) notificaron diferencias muy favorables (reducciones del 34-35% en la mortalidad) entre los tratados con los antagonistas y los tratados con un placebo. Los investigadores de BEST especularon que una posible explicación para la diferencia en los resultados “puede derivar de las propiedades farmacológicas únicas del bucindolol”.

En el ensayo CIBIS-II, el estudio se terminó también con anticipación, pero debido a que las tasas de mortalidad eran significativamente menores en los tratados con bisoprolol. CIBIS-II Investigators, 1999. De manera similar, en el estudio MERIT-HF con metoprolol, se finalizó prematuramente el estudio debido a que se había cumplido y sobrepasado el criterio definido previamente. MERIT-HF Study Group, 1999. El estudio COPERNICUS que implicaba carvedilol también se interrumpió con anticipación debido a los beneficios significativos observados con el tratamiento. Packer *et al.*, 2001. Los investigadores de BEST observaron que sus resultados planteaban preguntas sobre la equivalencia de los β -bloqueantes.

Además, en estudios sin mortalidad previos con carvedilol (Yancy *et al.*, 2001), no se observó ninguna diferencia en la respuesta entre sujetos negros y no negros, lo que es otra distinción relevante y específica con respecto a bucindolol. En el ensayo BEST, los pacientes negros con insuficiencia cardíaca avanzada mostraron un desenlace peor que los pacientes no negros. Bristow, 1997.

Una revisión de los diferentes ensayos mencionaba que “no puede proponerse ninguna explicación clara para el beneficio reducido obtenido con bucindolol en el estudio BEST”. Bouzamondo *et al.*, 2001 (encontrando que si se excluye el ensayo BEST, las pruebas indican una reducción del riesgo lograda con el tratamiento con β -bloqueantes). Aunque los autores dicen que su estudio sugiere que diferentes subgrupos de poblaciones con insuficiencia cardíaca tienen una respuesta diferente a la terapia con β -bloqueantes, no excluyen la posibilidad de que los diferentes β -bloqueantes tengan propiedades diferentes, tampoco dicen que los polimorfismos sean el motivo. Véase también Sallach *et al.*, 2003. (“Aunque algunas autoridades han sugerido que [la diferencia con el ensayo BEST] se debía a la población de pacientes examinada, otros creen que la falta de reducción de la mortalidad se debe al propio bucindolol”).

Por tanto, existen diferencias terapéuticas entre el bucindolol y otros β -bloqueantes, y existía una cuestión significativa referente a la eficacia terapéutica del bucindolol global. En consecuencia, no resultaba evidente ninguna relación entre bucindolol y variantes genéticas particulares.

El beneficio del análisis retrospectivo basado en los datos genéticos dados a conocer en el presente documento destaca las características farmacológicas únicas del bucindolol que contribuyen a su eficacia en el tratamiento de pacientes con insuficiencia cardíaca. Dos de estas características también tienen un papel decisivo en la interacción del fármaco con las variantes génicas del receptor adrenérgico.

La primera de estas características es la *simpaticolisis*, o la capacidad de un fármaco para reducir el impulso adrenérgico directamente (reducción de los niveles de norepinefrina en sangre y tejido). Tal como se observó anteriormente, entre los β -bloqueantes que se han usado para tratar la insuficiencia cardíaca, el bucindolol es único con respecto a esto (BEST Trial Investigators, 2001; Lowes *et al.*, 2000; Bristow *et al.*, 2004). Es probable que los efectos simpaticolíticos del bucindolol se deban al bloqueo del receptor β_2 junto con un bloqueo α_1 insuficiente para activar el impulso adrenérgico, y una actividad agonista inversa baja para los receptores β_1 y β_2 para minimizar la activación adrenérgica basándose en la depresión miocárdica. Otras propiedades del bucindolol que podrían contribuir a la simpaticolisis son la generación de óxido nítrico y el agonismo para el receptor β_3 (Strosberg, 1997). Estas dos últimas propiedades más o menos un bloqueo del receptor α_1 débil probablemente explican las propiedades vasodilatadoras leves del bucindolol (Gilbert *et al.*, 1990) que, a diferencia del carvedilol, no son lo suficientemente poderosas para desencadenar la activación adrenérgica refleja.

Cuando está presente en cantidades modestas, (reducciones más pequeñas en norepinefrina) la simpaticolisis es una propiedad favorable, que contribuye al efecto antiadrenérgico terapéutico del bucindolol. Éste es un mecanismo de acción potencialmente superior que el simple bloqueo β , ya que el exceso de norepinefrina se elimina del sistema. La norepinefrina es tóxica para el músculo cardíaco y en cantidades en exceso desencadena diversas rutas patológicas cardíacas. Sin embargo, cuando está exagerada, la simpaticolisis puede ser perjudicial y puede aumentar la mortalidad (Bristow *et al.*, 2004). Tal como se trata a continuación, el direccionamiento genético del bucindolol permite que esta propiedad funcione sólo de manera favorable.

La segunda propiedad farmacológica del bucindolol que interacciona con una diana farmacogenética es el bloqueo del receptor β_1 de alta afinidad (Hershberger *et al.*, 1990; Asano *et al.*, 2001). El bucindolol tiene una alta afinidad por receptores β_1 humanos, así como por receptores β_2 (Hershberger *et al.*, 1990). Además, a través de un efecto no agonista o bien sobre la traducción o bien sobre el recambio de proteína, el bucindolol reduce la densidad del receptor β_1 (Asano *et al.*, 2001). Debido a que se tolera tan bien, puede administrarse bucindolol a muy altas dosis de bloqueo β , y cada una de estas propiedades contribuye a sus efectos saludables sobre la variante génica 389Arg/Arg del receptor β_1 de alto funcionamiento (ejemplos, Mason *et al.*, 1999). Aunque el bucindolol tiene actividad simpaticomimética intrínseca (ASI) en miocardio de rata, en tejido cardíaco humano en funcionamiento el bucindolol carece de ASI (Bristow *et al.*, 1994; Sederberg *et al.*, 2000; Bristow *et al.*, 1998, ejemplo 7). Esto puede observarse claramente en la figura 13, paneles A y B, en los que no se produce ningún aumento significativo en el desarrollo de la fuerza en trabéculas de ventrículo derecho humano con insuficiencia aisladas, incluso en presencia de un aumento de la transducción de señales con el compuesto diterpénico forskolina, en los genotipos de portador de o bien Arg/Arg o bien Gly de β_1 AR. En cambio, tal como se muestra en la figura 13 panel C, el xamoterol como compuesto con ASI de control positivo presenta un aumento de la fuerza en la activación de la transducción de señales tanto baja como alta en el genotipo Arg/Arg de β_1 AR, pero sólo en el estado de alta activación logrado mediante el tratamiento previo con forskolina en portadores de Gly. Finalmente, tal como se muestra en la figura 13, en preparaciones de corazón humano aislado, el bucindolol tiene efectos únicos sobre receptores de portadores de Arg/Arg frente a Gly de β_1 AR. En condiciones de niveles bajos de transducción de señales (baja activación de receptores) en el corazón con insuficiencia (panel A), el bucindolol funciona como antagonista neutro (sin actividad agonista inversa ni agonista) en el receptor β_1 Arg/Arg miocárdico humano, pero cuando la transducción de señales es alta, tal como cuando se activa directamente la adenilil ciclasa mediante forskolina (panel B), el bucindolol funciona como un agonista inverso, inactivando el receptor tal como se indica mediante un factor de pendiente estadísticamente significativo hasta la concentración más alta que puede conseguirse en plasma mediante dosis terapéuticas, 10^{-6} M. No se produce ningún efecto de este tipo en receptores de portadores de Gly, en los que el bucindolol funciona como agonista inverso en

estados de baja activación, y antagonista neutro en presencia de forskolina. Estos datos sugieren que el bucindolol es únicamente eficaz en la antagonización de estados de alta activación del receptor β_1 389Arg/Arg, la forma del receptor que se esperaría que fuese la más cardiomiopática.

- 5 Estas propiedades son probablemente los motivos de los resultados inesperados y sorprendentes que se observaron con la variante genética Arg389 en el β_1 AR y la variante genética de Del322-325 en α_2 cAR en el contexto del tratamiento con bucindolol.

10 II. *Análisis del polimorfismo*

Debido a que las variantes genéticas están en regiones codificantes de los genes de β_1 -AR y α -AR y afectan a la proteína codificada, la presencia del polimorfismo Arg389 o Del322-325 puede determinarse a partir de la secuencia de o bien el ácido nucleico o bien la proteína. Como resultado, puede emplearse una variedad de diferentes metodologías para este fin.

15 A. *Ácidos nucleicos*

- 20 Ciertas realizaciones de la presente invención se refieren a diversos ácidos nucleicos, incluyendo cebadores para amplificación, sondas oligonucleotídicas y otros elementos de ácido nucleico implicados en el análisis de ADN genómico. En ciertos aspectos, un ácido nucleico comprende un ácido nucleico de tipo natural, mutante o polimórfico.

- 25 Por tanto, las expresiones polimorfismos de “receptor adrenérgico β_1 ” o polimorfismos de “ β_1 AR”, son términos de la técnica y se refieren a polimorfismos en la secuencia de ácido nucleico o aminoácidos de un gen o producto génico de receptor adrenérgico β_1 . Sólo para fines de referencia, los números de registro de GenBank J03019 (Gly389) y AF169007 (Arg389) son ejemplos de las formas de Gly y Arg 389 de la secuencia génica de receptor adrenérgico β_1 , respectivamente.

- 30 Además, por tanto, las expresiones polimorfismos de “receptor adrenérgico α_2 c” o polimorfismos de “ α_2 cAR”, son términos de la técnica y se refieren a polimorfismos en la secuencia de ácido nucleico o aminoácidos de un gen o producto génico de receptor adrenérgico α_2 c. Sólo para fines de referencia, el número de registro de GenBank NM00683 corresponde al tipo natural (sin delección) y AF280400 corresponde a la delección.

- 35 Para los fines de identificación de la ubicación de un polimorfismo, el primer nucleótido del codón de iniciación de la región codificante (la adenina del ATG en una molécula de ADN y la adenina del AUG en una molécula de ARN) del gen β_1 AR o α_2 c-AR se considera como el nucleótido “1” y los números avanzan según esto a lo largo de la secuencia codificante. De manera similar, el primer aminoácido del producto proteico traducido (la metionina) se considera como el aminoácido “1”.

- 40 La expresión “ácido nucleico” se conoce bien en la técnica. Un “ácido nucleico” tal como se usa en el presente documento se referirá generalmente a una molécula (es decir, una cadena) de ADN o ARN que comprende una nucleobase. Una nucleobase incluye, por ejemplo, una base de purina o pirimidina que se produce de manera natural que se encuentra en el ADN (por ejemplo, una adenina “A”, una guanina “G”, una timina “T” o una citosina “C”) o el ARN (por ejemplo, una A, una G, un uracilo “U” o una C). La expresión “ácido nucleico” abarca los términos “oligonucleótido” y “polinucleótido”, cada uno como un subgénero de la expresión “ácido nucleico”. El término “oligonucleótido” se refiere a una molécula de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 100 nucleobases de longitud. El término “polinucleótido” se refiere a al menos una molécula mayor de aproximadamente 100 nucleobases de longitud. Un “gen” se refiere a una secuencia codificante de un producto génico, así como intrones y el promotor del producto génico.

- 50 En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos de la invención comprenden o son complementarios a todos o 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1100, 1165, 1200, 1300, 1400, 1500 o más nucleótidos contiguos, o cualquier intervalo derivable en los mismos, de la secuencia de ADNc de β_1 AR humano con o bien una citosina o bien una guanina en la posición 1165 en la secuencia de ADNc o de la secuencia de ADNc de α_2 cAR con los nucleótidos 964-975 presentes o ausentes. Un experto en la técnica conoce cómo diseñar y usar cebadores y sondas para la hibridación y amplificación, incluyendo los límites de homología necesaria para implementar los cebadores y las sondas.

- 65 Estas definiciones se refieren generalmente a una molécula monocatenaria, pero en realizaciones específicas abarcarán también una cadena adicional que es parcial, sustancial o completamente complementaria a la molécula monocatenaria. Por tanto, un ácido nucleico puede abarcar una molécula bicatenaria o una molécula tricatenaria que comprende una o más cadena(s) complementaria(s) o “complemento(s)” de una secuencia particular que comprende

una molécula. Tal como se usa en el presente documento, un ácido nucleico monocatenario puede indicarse mediante el prefijo “mc”, un ácido nucleico bicatenario mediante el prefijo “bc” y un ácido nucleico tricatenario mediante el prefijo “tc”.

En aspectos particulares, un ácido nucleico codifica para una proteína, un polipéptido o un péptido. En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a composiciones novedosas que comprenden al menos una molécula proteica. Tal como se usa en el presente documento, una “molécula proteica”, “composición proteica”, “compuesto proteico”, “cadena proteica” o “material proteico” se refiere generalmente, pero no se limita a, una proteína mayor de aproximadamente 200 aminoácidos o la secuencia endógena de longitud completa traducida a partir de un gen; un polipéptido mayor de aproximadamente 100 aminoácidos; y/o un péptido de desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 100 aminoácidos. Todos los términos “proteicos” descritos anteriormente pueden usarse de manera intercambiable en el presente documento.

1. Preparación de ácidos nucleicos

Un ácido nucleico puede prepararse mediante cualquier técnica conocida para un experto en la técnica, tal como por ejemplo, síntesis química, producción enzimática o producción biológica. Los ejemplos no limitativos de un ácido nucleico sintético (por ejemplo, un oligonucleótido sintético), incluyen un ácido nucleico preparado mediante síntesis química *in vitro* usando química de fosfotriéster, fosfito o fosforamidita y técnicas en fase sólida tales como las descritas en la patente europea 266.032, o por medio de productos intermedios de H-fosfonato de desoxinucleósido tal como se describe por Froehler *et al.*, 1986 y la patente estadounidense 5.705.629. En los métodos de la presente invención, pueden usarse uno o más oligonucleótidos. Se han dado a conocer diversos mecanismos diferentes de síntesis de oligonucleótidos en, por ejemplo, las patentes estadounidenses 4.659.774, 4.816.571, 5.141.813, 5.264.566, 4.959.463, 5.428.148, 5.554.744, 5.574.146, 5.602.244.

Un ejemplo no limitativo de un ácido nucleico producido enzimáticamente incluye uno producido por enzimas en reacciones de amplificación tales como PCRTM (véase, por ejemplo, la patente estadounidense 4.683.202 y la patente estadounidense 4.682.195), o la síntesis de un oligonucleótido descrita en la patente estadounidense 5.645.897. Un ejemplo no limitativo de un ácido nucleico producido biológicamente incluye un ácido nucleico recombinante producido (es decir, replicado) en una célula viva, tal como un vector de ADN recombinante replicado en bacterias (véase por ejemplo, Sambrook *et al.* 2001).

2. Purificación de ácidos nucleicos

Puede purificarse un ácido nucleico en geles de poliacrilamida, gradientes de centrifugación de cloruro de cesio, columnas de cromatografía o mediante cualquier otro medio conocido para un experto habitual en la técnica (véase por ejemplo, Sambrook *et al.*, 2001). En algunos aspectos, un ácido nucleico es un ácido nucleico farmacológicamente aceptable. Los expertos en la técnica conocen composiciones farmacológicamente aceptables, y se describen en el presente documento.

En ciertos aspectos, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que es un ácido nucleico aislado. Tal como se usa en el presente documento, la expresión “ácido nucleico aislado” se refiere a una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ADN o ARN) que se ha aislado libre de, o por lo demás está libre de, la masa de los ácidos nucleicos transcritos y genómicos totales de una o más células. En ciertas realizaciones, “ácido nucleico aislado” se refiere a un ácido nucleico que se ha aislado libre de, o por lo demás está libre de, la masa de componentes celulares o componentes de reacción *in vitro* tales como, por ejemplo, macromoléculas tales como lípidos o proteínas, moléculas biológicas pequeñas y similares.

3. Segmentos de ácidos nucleicos

En ciertas realizaciones, el ácido nucleico es un segmento de ácido nucleico. Tal como se usa en el presente documento, la expresión “segmento de ácido nucleico”, representa fragmentos de un ácido nucleico, tales como, para un ejemplo no limitativo, los que codifican para sólo parte de un locus del gen β_1 AR o una secuencia del gen β_1 AR, o parte de la secuencia del gen o locus del gen α_{2c} AR. Por tanto, un “segmento de ácido nucleico” puede comprender cualquier parte de una secuencia génica, incluyendo desde aproximadamente 2 nucleótidos hasta el gen de longitud completa incluyendo regiones promotoras para la señal de poliadenilación y cualquier longitud que incluya toda la región codificante.

Pueden diseñarse diversos segmentos de ácido nucleico basándose en una secuencia de ácido nucleico particular, y puede ser de cualquier longitud. Asignando valores numéricos a una secuencia, por ejemplo, el primer residuo es 1, el segundo residuo es 2, etc., puede crearse un algoritmo que define todos los segmentos de ácido nucleico:

$$n \text{ hasta } n + y$$

en el que n es un número entero desde 1 hasta el último número de la secuencia e y es la longitud del segmento de ácido nucleico menos uno, en el que n + y no supera el último número de la secuencia. Por tanto, para un 10-mero, los segmentos de ácido nucleico corresponden a las bases de 1 a 10, de 2 a 11, de 3 a 12, etc. Para un 15-mero,

los segmentos de ácido nucleico corresponden a las bases de 1 a 15, de 2 a 16, de 3 a 17, etc. Para un 20-mero, los segmentos nucleicos corresponden a las bases de 1 a 20, de 2 a 21, de 3 a 22, etc. En ciertas realizaciones, el segmento de ácido nucleico puede ser una sonda o un cebador. Tal como se usa en el presente documento, una “sonda” se refiere generalmente a un ácido nucleico usado en una composición o un método de detección. Tal como se usa en el presente documento, un “cebador” se refiere generalmente a un ácido nucleico usado en una composición o un método de amplificación o extensión.

4. Complementos de ácidos nucleicos

La presente invención también abarca un ácido nucleico que es complementario a un ácido nucleico. Un ácido nucleico es un/unos “complemento(s)” o es “complementario” a otro ácido nucleico cuando puede realizar un apareamiento de bases con otro ácido nucleico según las reglas de complementariedad de unión de Hoogsteen inversas, Hoogsteen o Watson-Crick convencionales. Tal como se usa en el presente documento, “otro ácido nucleico” puede referirse a una molécula separada o a una secuencia separada espacial de la misma molécula. En realizaciones preferidas, un complemento es una sonda de hibridación o un cebador de amplificación para la detección de un polimorfismo de ácido nucleico.

Tal como se usa en el presente documento, el término “complementario” o “complemento” también se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleobases consecutivas o nucleobases semiconsecutivas (por ejemplo, uno o más restos de nucleobase no están presentes en la molécula) que puede hibridar con otra cadena o dúplex de ácido nucleico incluso si menos de todas las nucleobases no realizan un apareamiento de bases con una nucleobase equivalente. Sin embargo, en algunas realizaciones de detección o de diagnóstico, se prefieren ácidos nucleicos completamente complementarios.

5. Detección y evaluación de ácidos nucleicos

Se realizó el genotipado usando métodos exactamente tal como se describieron previamente en Small *et al.*, (2002). Los expertos entenderán que otras técnicas convencionales están disponibles para el genotipado y que puede usarse cualquier técnica con la presente invención. Se proporcionan a continuación métodos generales de métodos de detección de ácidos nucleicos, seguidos por ejemplos específicos empleados para la identificación de polimorfismos, incluyendo polimorfismos de un único nucleótido (SNP).

El método de genotipado particular usado para determinar el genotipo de un individuo que necesita una terapia con β -bloqueantes no es parte de la presente invención, pero en resumen implica aislar del individuo una mezcla de ácidos nucleicos que comprende las dos copias del gen β_1 AR, o un fragmento del mismo, que están presentes en el individuo, y determinar la identidad del par de nucleótidos en la posición 1165 en el β_1 AR o determinar si hay una delección de los nucleótidos 964-975 en el gen α_{2c} AR. Los polimorfismos y sitios polimórficos preferidos en un gen para un β_1 AR y α_{2c} AR incluyen los siguientes en la tabla 1:

TABLA 1

Polimorfismo de receptor adrenérgico β_1				
Posición de nucleótido	Nucleótido	Posición de aminoácido	Aminoácido	Designaciones
1165	G o C	389	Gly o Arg	Gly389, Arg389
Polimorfismo de receptor adrenérgico α_{2c}				
Posición de nucleótido	Nucleótido	Posiciones de aminoácido	Aminoácido	Designaciones
964-975	delección	322-325	delección	α_{2c} Del322-325

Se han notificado previamente estos polimorfismos. Las secuencias de nucleótidos de β_1 AR de tipo natural comprenden generalmente una guanina en el nucleótido 1165. Las secuencias de proteína de β_1 AR de tipo natural comprenden generalmente una glicina en el aminoácido 389. Lo que se considera secuencias de nucleótidos de α_{2c} AR de tipo natural significa generalmente que no hay ninguna delección de los nucleótidos 964-975 y por tanto ninguna delección de los aminoácidos 322-325.

Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente que las moléculas de ácido nucleico pueden ser moléculas bicatenarias y que la referencia a un sitio particular en una cadena se refiere, también, al sitio correspondiente en una cadena complementaria. Por tanto, en la definición de un sitio polimórfico, la referencia a una adenina, una timina (uridina), una citosina o una guanina en un sitio particular en la cadena positiva (sentido o codificante) de una molécula

de ácido nucleico también pretende incluir la timina (uridina), adenina, guanina o citosina (respectivamente) en el sitio correspondiente en una cadena negativa (antisentido o no codificante) de una cadena complementaria de una molécula de ácido nucleico. Por tanto, puede hacerse referencia a cualquiera de las cadenas y todavía comprende el mismo sitio polimórfico y puede diseñarse un oligonucleótido para hibridar con cualquiera de las cadenas. En todo el texto, en la
 5 identificación de un sitio polimórfico, se hace referencia a la cadena sentido, sólo para fines de conveniencia.

Normalmente, la mezcla de ácidos nucleicos se aísla de una muestra biológica extraída del individuo, tal como una muestra de sangre o una muestra de tejido usando técnicas convencionales tales como las dadas a conocer en Jones (1963). Las muestras de tejido adecuadas incluyen sangre completa, semen, saliva, lágrimas, orina, materia
 10 fecal, sudor, mucosa oral, piel y cabello. La mezcla de ácidos nucleicos puede estar compuesta por ADN genómico, ARNm o ADNc y, en los últimos dos casos, la muestra biológica debe obtenerse de un órgano en el que se expresa el gen β_1 AR. Además, los expertos en la técnica entenderán que las preparaciones de ARNm o ADNc no se usarán para detectar polimorfismos ubicados en intrones o en regiones no transcritas en 5' y 3'. Si se aísla un fragmento del gen β_1 AR, debe contener el/los sitio(s) polimórfico(s) que va(n) a genotiparse.

La capacidad para predecir la respuesta de un paciente a un agonista β es útil para los médicos en la toma de decisiones sobre cómo tratar un paciente que tiene insuficiencia cardíaca. Un paciente cuyo genotipo indica que el paciente probablemente responderá bien al agonista será un mejor candidato para la terapia con β -bloqueantes que un
 20 paciente que es probable que presente una respuesta intermedia o no presente respuesta, y el médico podrá determinar con menos ensayo y error qué individuos deben recibir una forma alternativa de terapia.

En los métodos de genotipado usados en la presente invención, puede determinarse la identidad de un nucleótido (o par de nucleótidos) en un sitio polimórfico amplificando una región o regiones diana que contiene(n) el/los sitio(s) polimórfico(s) directamente a partir de una o ambas copias del gen β_1 AR y/o el gen α_{2c} AR presentes en el individuo
 25 y determinarse la secuencia de la región o regiones amplificada(s) mediante métodos convencionales. El experto en la técnica apreciará fácilmente que se detectará sólo un nucleótido en un sitio polimórfico en individuos que son homocigotos en ese sitio, mientras que se detectarán dos nucleótidos diferentes si el individuo es heterocigoto para ese sitio. El polimorfismo puede identificarse directamente, conocido como identificación del tipo positivo, o mediante deducción, denominada identificación de tipo negativo. Por ejemplo, cuando se conozca que un SNP es guanina y
 30 citosina en una población de referencia, puede determinarse positivamente que un sitio es o bien guanina o bien citosina para un individuo homocigoto en ese sitio, o tanto guanina como citosina, si el individuo es heterocigoto en ese sitio. Alternativamente, puede determinarse negativamente que el sitio no es guanina (y por tanto citosina/citosina) ni citosina (y por tanto guanina/guanina).

Puede(n) amplificarse la región o regiones diana usando cualquier método de amplificación dirigida por oligonucleótidos, incluyendo pero sin limitarse a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (patente estadounidense n.º 4.965.188), la reacción en cadena por ligasa (LCR) (Barany *et al.*, 1991; documento WO90/01069) y el ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA) (Landegren *et al.*, 1988). Los oligonucleótidos útiles como cebadores o sondas en
 40 tales métodos deben hibridar específicamente con una región del ácido nucleico que contiene o es adyacente al sitio polimórfico. Normalmente, los oligonucleótidos tienen entre 10 y 35 nucleótidos de longitud y, preferiblemente, entre 15 y 30 nucleótidos de longitud. Lo más preferiblemente, los oligonucleótidos tienen de 20 a 25 nucleótidos de largo. La longitud exacta del oligonucleótido dependerá de muchos factores que el experto en la técnica considera y pone en práctica de manera rutinaria.

Pueden usarse otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico conocidos para amplificar la región diana incluyendo sistemas amplificación basados en transcripción. (patente estadounidense n.º 5.130.238; documento EP 329.822; patente estadounidense n.º 5.169.766, documento WO89/06700) y métodos isotérmicos (Walker *et al.*, 1992).

También puede someterse a ensayo un polimorfismo en la región diana antes o después de la amplificación usando uno de varios métodos basados en hibridación conocidos en la técnica. Normalmente, se utilizan oligonucleótidos específicos de alelo en la realización de tales métodos. Pueden usarse los oligonucleótidos específicos de alelo como
 50 pares de sondas marcadas de manera diferente, mostrando un miembro del par un apareamiento perfecto con una variante de una secuencia diana y mostrando el otro miembro un apareamiento perfecto con una variante diferente. En algunas realizaciones, puede detectarse más de un sitio polimórfico de una sola vez usando un conjunto de pares de oligonucleótidos u oligonucleótidos específicos de alelo.

Puede realizarse la hibridación de un oligonucleótido específico de alelo con un polinucleótido diana con ambas entidades en disolución, o puede realizarse tal hibridación cuando o bien el oligonucleótido o bien el polinucleótido
 60 diana está fijado de manera covalente o no covalente a un soporte sólido. Por ejemplo, la unión puede estar mediada por interacciones anticuerpo-antígeno, poli-L-Lys, estreptavidina o avidina-biotina, puentes salinos, interacciones hidrófobas, enlaces químicos, secado, reticulación por UV, etc. Pueden sintetizarse oligonucleótidos específicos de alelo directamente sobre el soporte sólido o unirse al soporte sólido posteriormente a la síntesis. Los soportes sólidos adecuados para su uso en los métodos de detección de la invención incluyen sustratos compuestos por silicio, vidrio, plástico, papel y similares que pueden formarse, por ejemplo, en pocillos (como en placas de 96 pocillos), portaobjetos, láminas, membranas, fibras, chips, placas y perlas. El soporte sólido puede tratarse, recubrirse o derivatizarse para facilitar la inmovilización del oligonucleótido específico de alelo o ácido nucleico diana.

También puede determinarse el genotipo de uno o más sitios polimórficos en el gen β_1 AR de un individuo mediante hibridación de una o ambas copias del gen, o un fragmento del mismo, con matrices y submatrices de ácido nucleico tal como se describe en el documento WO 95/11995. Las matrices contendrán una batería de oligonucleótidos específicos de alelo que representan cada uno de los sitios polimórficos que van a incluirse en el genotipo o haplotipo.

También puede determinarse la identidad de los polimorfismos usando una técnica de detección de apareamientos erróneos, incluyendo pero sin limitarse al método de protección de ARNasa usando ribosondas (Winter *et al.*, 1985; Meyers *et al.*, 1985) y proteínas que reconocen apareamientos erróneos de nucleótidos, tales como la proteína mutS de *E. coli* (Modrich, 1991). Alternativamente, pueden identificarse variantes alélicas mediante análisis de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) (Orita *et al.*, 1989; Humphries, *et al.*, 1996) o electroforesis en gel en gradiente desnaturalizante (DGGE) (Wartell *et al.*, 1990; Sheffield *et al.*, 1989).

También puede usarse un método de extensión de cebadores mediada por polimerasa para identificar el/los polimorfismo(s). Se han descrito varios métodos de este tipo en la bibliografía científica y de patentes. Pueden detectarse cebadores extendidos que contienen un polimorfismo mediante espectrometría de masas tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.605.798. Otro método de extensión de cebadores es la PCR específica de alelo (Ruano *et al.*, 1989); Ruano *et al.*, 1991; documento WO 93/22456; Turki *et al.*, 1995).

También puede detectarse la variación polimórfica en la posición de nucleótido 1165 del gen β_1 AR humano usando digestión diferencial del ADN mediante ciertas enzimas de restricción (Small *et al.*, 2002) o mediante cualquier otro método que identifique el nucleótido en la posición 1165 del gen β_1 AR.

a. Hibridación

El uso de una sonda o un cebador de entre 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100 nucleótidos, preferiblemente de entre 17 y 100 nucleótidos de longitud, o en algunos aspectos de la invención hasta 1-2 kilobases o más de longitud, permite la formación de una molécula dúplex que es tanto estable como selectiva. Se prefieren generalmente moléculas que tienen secuencias complementarias sobre tramos contiguos mayores de 20 bases de longitud, para aumentar la estabilidad y/o selectividad de las moléculas híbridas obtenidas. Se preferirá generalmente diseñar moléculas de ácido nucleico para hibridación que tengan una o más secuencias complementarias de 20 a 30 nucleótidos, o incluso más largas cuando se desee. Pueden prepararse fácilmente tales fragmentos, por ejemplo, sintetizando directamente el fragmento mediante medios químicos o introduciendo secuencias seleccionadas en vectores recombinantes para producción recombinante.

Por consiguiente, las secuencias de nucleótidos de la invención pueden usarse por su capacidad de formar selectivamente moléculas dúplex con tramos complementarios de los ADN y/o los ARN o proporcionar cebadores para la amplificación de ADN o ARN a partir de muestras. Dependiendo de la aplicación prevista, se deseará emplear condiciones de hibridación variables para conseguir grados de selectividad variables de la sonda o los cebadores para la secuencia diana.

Para aplicaciones que requieren alta selectividad, se deseará normalmente emplear condiciones de rigurosidad relativamente alta para formar los híbridos. Por ejemplo, condiciones de temperatura alta y/o sal relativamente baja, tales como las proporcionadas mediante NaCl de aproximadamente 0,02 M a aproximadamente 0,10 M a temperaturas de aproximadamente 50°C a aproximadamente 70°C. Tales condiciones de rigurosidad alta toleran poco, si es alguno, apareamiento erróneo entre la sonda o los cebadores y el molde o la cadena diana y serán particularmente adecuadas para aislar genes específicos o para detectar un polimorfismo específico. Se aprecia generalmente que las condiciones pueden hacerse más rigurosas mediante la adición de cantidades crecientes de formamida. Por ejemplo, en condiciones altamente rigurosas, puede llevarse a cabo la hibridación con ADN unido al filtro en NaHPO_4 0,5 M, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, EDTA 1 mM a 65°C, y lavando en 0,1 x SSC/SDS al 0,1% a 68°C (Ausubel *et al.*, 1989).

Las condiciones pueden hacerse menos rigurosas aumentando la concentración de sal y/o disminuyendo la temperatura. Por ejemplo, puede proporcionarse una condición de rigurosidad media mediante NaCl aproximadamente de 0,1 a 0,25 M a temperaturas de aproximadamente 37°C a aproximadamente 55°C, mientras que puede proporcionarse una condición de rigurosidad baja mediante sal de aproximadamente 0,15 M a aproximadamente 0,9 M, a temperaturas que oscilan desde aproximadamente 20°C hasta aproximadamente 55°C. En condiciones rigurosas bajas, tales como las condiciones moderadamente rigurosas puede llevarse a cabo el lavado por ejemplo en 0,2 x SSC/SDS al 0,1% a 42°C (Ausubel *et al.*, 1989). Las condiciones de hibridación pueden manipularse fácilmente dependiendo de los resultados deseados.

En otras realizaciones, puede conseguirse la hibridación en condiciones de, por ejemplo, Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), KCl 75 mM, MgCl_2 3 mM, ditiotritol 1,0 mM, a temperaturas de entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 37°C. Otras condiciones de hibridación utilizadas pueden incluir aproximadamente Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl_2 1,5 mM, a temperaturas que oscilan desde aproximadamente 40°C hasta aproximadamente 72°C.

En ciertas realizaciones, será ventajoso emplear ácidos nucleicos de secuencias definidas de la presente invención en combinación con un medio apropiado, tal como un marcador, para determinar la hibridación. Una amplia variedad de medios indicadores apropiados se conocen en la técnica, incluyendo ligandos fluorescentes, radioactivos, enzimáticos u otros, tales como avidina/biotina, que pueden detectarse. En realizaciones preferidas, puede desearse emplear

una marcador fluorescente o una etiqueta de enzima tal como ureasa, fosfatasa alcalina o peroxidasa, en lugar de reactivos radioactivos u otros no deseables desde el punto de vista medioambiental. En el caso de etiquetas de enzima, se conoce que pueden emplearse sustratos como indicadores colorimétricos para proporcionar un medio de detección que es detectable visible o espectrofotométricamente, para identificar una hibridación específica con muestras que contienen ácido nucleico complementario. En otros aspectos, puede estar presente un sitio de escisión de nucleasa particular y puede determinarse la detección de una secuencia de nucleótidos particular mediante la presencia o ausencia del corte de ácido nucleico.

En general, se prevé que las sondas o los cebadores descritos en el presente documento serán útiles como reactivos en hibridación en disolución, tal como en PCR, para la detección de la expresión o el genotipo de los genes correspondientes, así como en realizaciones que emplean una fase sólida. En realizaciones que implican una fase sólida, se adsorbe o se adhiere de otro modo el ADN (o ARN) de prueba a una superficie o matriz seleccionada. Entonces se somete a hibridación este ácido nucleico monocatenario, fijado, con sondas seleccionadas en las condiciones deseadas. Las condiciones seleccionadas dependerán de las circunstancias particulares (dependiendo, por ejemplo, del contenido en G+C, tipo del ácido nucleico diana, fuente del ácido nucleico, tamaño de la sonda de hibridación, etc.). Los expertos en la técnica conocen bien la optimización de las condiciones de hibridación para la aplicación de interés particular. Tras el lavado de las moléculas hibridadas para eliminar moléculas de sonda unidas de manera no específica, se detecta la hibridación, y/o se cuantifica, determinando la cantidad de marcador unido. En las patentes estadounidenses 5.843.663, 5.900.481 y 5.919.626 se dan a conocer métodos de hibridación en fase sólida representativos. Otros métodos de hibridación que pueden usarse en la práctica de la presente invención se dan a conocer en las patentes estadounidenses 5.849.481, 5.849.486 y 5.851.772.

b. Amplificación de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos usados como molde para la amplificación pueden aislarse a partir de células, tejidos u otras muestras según metodologías habituales (Sambrook *et al.*, 2001). En ciertas realizaciones, se realiza el análisis en muestras de fluidos biológicos u homogeneizados de tejidos o células completos con o sin purificación sustancial del ácido nucleico molde. El ácido nucleico puede ser ADN genómico o ARN celular completo o fraccionado. Cuando se usa ARN, puede desearse convertir en primer lugar el ARN en un ADN complementario.

El término “cebador”, tal como se usa en el presente documento, pretende abarcar cualquier ácido nucleico que puede participar como cebador en la síntesis de un ácido nucleico naciente en un proceso dependiente de molde. Normalmente, los cebadores son oligonucleótidos de desde diez hasta veinte y/o treinta pares de bases de longitud, pero pueden emplearse secuencias más largas. Pueden proporcionarse los cebadores de forma monocatenaria y/o bicatenaria, aunque se prefiere la forma monocatenaria.

Los pares de cebadores diseñados para hibridar selectivamente con ácidos nucleicos correspondientes al locus del gen de β_1 AR, o variantes del mismo, y fragmentos del mismo se ponen en contacto con el ácido nucleico molde en condiciones que permiten una hibridación selectiva. Dependiendo de la aplicación deseada, pueden seleccionarse condiciones de hibridación de rigurosidad alta que sólo permitirán la hibridación con secuencias que son completamente complementarias a los cebadores. En otras realizaciones, puede producirse la hibridación en rigurosidad reducida para permitir la amplificación de ácidos nucleicos que contienen uno o más apareamientos erróneos con las secuencias de cebador. Una vez hibridado, el complejo de molde-cebador se pone en contacto con una o más enzimas que facilitan la síntesis de ácido nucleico dependiente de molde. Se realizan múltiples rondas de amplificación, también denominadas “ciclos”, hasta que se produzca una cantidad suficiente de producto de amplificación.

El producto de amplificación puede detectarse, analizarse o cuantificarse. En ciertas aplicaciones, puede realizarse la detección mediante medios visuales. En ciertas aplicaciones, la detección puede implicar la identificación indirecta del producto por medio de quimioluminiscencia, gammagrafía radioactiva de un marcador fluorescente o radiomarcador incorporado o incluso por medio de un sistema que usa señales de impulso térmico y/o eléctrico (Affymax technology; Bellus, 1994).

Una serie de procesos dependientes de molde están disponibles para amplificar las secuencias de oligonucleótidos presentes en una muestra de molde dada. Uno de los mejores métodos de amplificación conocidos es la reacción en cadena de la polimerasa (denominada PCRTM) que se describe en detalle en las patentes estadounidenses 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159, y en Innis *et al.*, 1988.

Otro método para la amplificación es la reacción en cadena por ligasa (“LCR”), dado a conocer en la solicitud europea n.º 320 308. La patente estadounidense 4.883.750 describe un método similar a la LCR para unir pares de sondas a una secuencia diana. También puede usarse un método basado en PCRTM y ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA) (descrito con mayor detalle a continuación), dado a conocer en la patente estadounidense 5.912.148.

Métodos alternativos para la amplificación de secuencias de ácido nucleico diana que pueden usarse en la práctica de la presente invención se dan a conocer en las patentes estadounidenses 5.843.650, 5.846.709; 5.846.783, 5.849.546, 5.849.497, 5.849.547, 5.858.652, 5.866.366, 5.916.776, 5.922.574, 5.928.905, 5.928.906, 5.932.451, 5.935.825, 5.939.291 y 5.942.391, solicitud británica 2 202 328, y en la solicitud PCT PCT/US89/01025. También puede usarse Qbeta replicasa, descrita en la solicitud PCT PCT/US87/00880, como método de amplificación en la presente invención.

Un método de amplificación isotérmico, en el que se usan ligasas y endonucleasas de restricción para conseguir la amplificación de moléculas diana que contiene nucleótidos 5'-[alfa-tio]-trifosfato en una cadena de un sitio de restricción también puede ser útil en la amplificación de ácidos nucleicos en la presente invención (Walker *et al.*, 1992). La amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), dada a conocer en la patente estadounidense 5.916.779, es otro método de llevar a cabo la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos, que implica múltiples rondas de desplazamiento de cadena y síntesis, es decir, traslado de mellas.

Otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico incluyen sistemas de amplificación basados en transcripción (TAS), incluyendo amplificación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA) y 3SR (Kwoh *et al.*, 1989; solicitud PCT WO 88/10315). La solicitud europea 329 822 da a conocer un proceso de amplificación de ácido nucleico que implica sintetizar de manera cíclica ARN monocatenario ("ARNmc"), ADNmc y ADN bicatenario (ADNbc); que puede usarse según la presente invención.

La solicitud PCT WO 89/06700 da a conocer un esquema de amplificación de secuencias de ácido nucleico basándose en la hibridación de una región promotora/secuencia de cebador con un ADN monocatenario diana ("ADNmc") seguida por la transcripción de muchas copias de ARN de la secuencia. Este esquema no es cíclico, es decir, no se producen nuevos moldes a partir de los transcritos de ARN resultantes. Otros métodos de amplificación incluyen "RACE" y "PCR unilateral" (Frohman, 1990; Ohara *et al.*, 1989).

c. Detección de ácidos nucleicos

Tras cualquier amplificación, puede ser deseable separar el producto de amplificación del molde y/o el cebador en exceso. En una realización, se separan los productos de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa, agarosa-acrilamida o poliacrilamida usando métodos convencionales (Sambrook *et al.*, 2001). Los productos de amplificación separados pueden cortarse y eluirse del gel para su manipulación adicional. Usando geles de agarosa de bajo punto de fusión, puede eliminarse la banda separada calentando el gel, seguido por extracción del ácido nucleico.

También puede efectuarse la separación de ácidos nucleicos mediante columnas de centrifugación y/o técnicas cromatográficas conocidas en la técnica. Existen muchos tipos de cromatografía que pueden usarse en la práctica de la presente invención, incluyendo cromatografía de adsorción, de reparto, de intercambio iónico, con hidroxilapatita, de tamiz molecular, en fase inversa, en columna, en papel, en capa fina y de gases así como HPLC.

En ciertas realizaciones, se visualizan los productos de amplificación, con o sin separación. Un método de visualización típico implica la tinción de un gel con bromuro de etidio y la visualización de las bandas con luz UV. Alternativamente, si los productos de amplificación están marcados íntegramente con nucleótidos marcados fluorométricamente o radiomarcados, pueden exponerse los productos de amplificación separados a una película de rayos X o visualizarse en los espectros de excitación apropiados.

En una realización, tras la separación de los productos de amplificación, se pone en contacto una sonda de ácido nucleico marcada con la secuencia marcadora amplificada. La sonda preferiblemente se conjuga a un cromóforo pero puede radiomarcarse. En otra realización, la sonda se conjuga a un componente de unión, tal como un anticuerpo o biotina, u otro componente de unión que porta un resto detectable.

En realizaciones particulares, la detección es mediante transferencia de tipo Southern y la hibridación con una sonda marcada. Los expertos en la técnica conocen bien las técnicas implicadas en la transferencia de tipo Southern (véase Sambrook *et al.*, 2001). Un ejemplo de lo anterior se describe en la patente estadounidense 5.279.721, que da a conocer un aparato y un método para la transferencia y electroforesis automatizada de ácidos nucleicos. El aparato permite la electroforesis y la transferencia sin manipulación externa del gel y es idealmente adecuado para llevar a cabo los métodos según la presente invención.

Otros métodos de detección de ácidos nucleicos que pueden usarse en la práctica de la presente invención se dan a conocer en las patentes estadounidenses 5.840.873, 5.843.640, 5.843.651, 5.846.708, 5.846.717, 5.846.726, 5.846.729, 5.849.487, 5.853.990, 5.853.992, 5.853.993, 5.856.092, 5.861.244, 5.863.732, 5.863.753, 5.866.331, 5.905.024, 5.910.407, 5.912.124, 5.912.145, 5.919.630, 5.925.517, 5.928.862, 5.928.869, 5.929.227, 5.932.413 y 5.935.791.

d. Otros ensayos

Otros métodos de selección genética pueden usarse dentro del alcance de la presente invención, por ejemplo, para detectar mutaciones en muestras de ADN genómico, ADNc y/o ARN. Los métodos usados para detectar mutaciones puntuales incluyen electroforesis en gel de gradiente de desnaturalización ("DGGE"), análisis de polimorfismo de longitud del fragmento de restricción ("PLFR"), métodos de escisión enzimática o química, secuenciación directa de regiones diana amplificadas mediante PCRTM (véase anteriormente), análisis de polimorfismo conformacional monocatenario ("SSCP") y otros métodos bien conocidos en la técnica.

Un método de selección de mutaciones puntuales se basa en la escisión por ARNasa de apareamientos erróneos de pares de bases en heterodúplex de ARN/ADN o ARN/ARN. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "apareamiento erróneo" se define como una región de uno o más nucleótidos mal apareados o no apareados en una mo-

lícula de ARN/ARN, ARN/ADN o ADN/ADN bicatenaria. Por tanto esta definición incluye apareamientos erróneos debidos a mutaciones por inserción/delección, así como mutaciones puntuales de bases individuales o múltiples.

La patente estadounidense 4.946.773 describe un ensayo de escisión de apareamientos erróneos por ARNasa A que implica aparear muestras de prueba de ARN o ADN monocatenario con una sonda de ARN, y el tratamiento posterior de los dúplex de ácido nucleico con ARNasa A. Para la detección de apareamientos erróneos, los productos monocatenarios del tratamiento con ARNasa A, separados con electroforesis según su tamaño, se comparan con dúplex control tratados de manera similar. Las muestras que contienen fragmentos más pequeños (productos de escisión) no observados en el dúplex control se califican como positivos.

Otros investigadores han descrito el uso de ARNasa I en ensayos de apareamiento erróneo. El uso de ARNasa I para la detección de apareamientos erróneos se describe en la bibliografía de Promega Biotech. Promega comercializa un kit que contiene ARNasa I que se notifica que escinde tres de cada cuatro apareamientos erróneos conocidos. Otros han descrito usar la proteína MutS u otras enzimas de reparación de ADN para la detección de apareamientos erróneos de una sola base.

Métodos alternativos para la detección de mutaciones por delección, inserción o sustitución que pueden usarse en la práctica de la presente invención se dan a conocer en las patentes estadounidenses 5.849.483, 5.851.770, 5.866.337, 5.925.525 y 5.928.870.

e. Ejemplos específicos de métodos de selección de ácidos nucleicos con polimorfismo

Las mutaciones espontáneas que surgen durante el transcurso de la evolución en los genomas de los organismos a menudo no se transmiten inmediatamente en todos los miembros de la especie, creando de ese modo alelos polimórficos que coexisten en las poblaciones de la especie. A menudo los polimorfismos son la causa de las enfermedades genéticas. Se han identificado varias clases de polimorfismos. Por ejemplo, los polimorfismos del tipo de nucleótidos variables (VNTR), surgen de las duplicaciones en tándem espontáneas de motivos repetidos de di o trinucleótidos de los nucleótidos. Si tales variaciones alteran las longitudes de fragmentos de ADN generados mediante escisión por endonucleasa de restricción, las variaciones se denominan polimorfismos de longitud del fragmento de restricción (RFLP). Los RFLP están usándose ampliamente en análisis genéticos en animales y seres humanos.

Otra clase de polimorfismos se genera mediante el reemplazo de un solo nucleótido. Tales polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) raras veces dan como resultado cambios en un sitio de endonucleasa de restricción. Por tanto, los SNP raras veces son análisis de longitud del fragmento de restricción detectables. Los SNP son las variaciones genéticas más comunes y se producen una vez cada 100 a 300 bases y se ha encontrado que varias mutaciones por SNP afectan a un solo nucleótido en un gen que codifica para proteína de manera suficiente para provocar realmente una enfermedad genética. Las enfermedades por SNP están representadas a modo de ejemplo por la hemofilia, anemia de células falciformes, hemocromatosis hereditaria, enfermedad de Alzheimer de aparición tardía etc.

Se han desarrollado varios métodos para seleccionar polimorfismos y algunos ejemplos se enumeran a continuación. La bibliografía de Kwok y Chen (2003) y Kwok (2001) proporcionan visiones generales de algunos de estos métodos.

Los SNP en relación con ABCC2 pueden caracterizarse mediante el uso de cualquiera de estos métodos o una modificación adecuada de los mismos. Tales métodos incluyen la secuenciación directa o indirecta del sitio, el uso de enzimas de restricción cuando los alelos respectivos del sitio crean o destruyen un sitio de restricción, el uso de sondas de hibridación específicas de alelo, el uso de anticuerpos que son específicos para las proteínas codificadas por los diferentes alelos del polimorfismo, o cualquier otra interpretación bioquímica.

i. Secuenciación de ADN

El método más comúnmente usado de caracterización de un polimorfismo es la secuenciación de ADN directa del locus genético que flanquea e incluye el polimorfismo. Tal análisis puede conseguirse usando o bien el "método de terminación de cadena didesoxi-mediado", también conocido como el "método de Sanger" (Sanger *et al.*, 1975) o el "método de degradación química", también conocido como el "método de Maxam-Gilbert" (Maxam *et al.*, 1977). La secuenciación en combinación con las tecnologías de amplificación específica de secuencia genómica, tales como la reacción en cadena de la polimerasa, puede utilizarse para facilitar la recuperación de los genes deseados (Mullis *et al.*, 1986; solicitud de patente europea 50.424; solicitud de patente europea 84.796, solicitud de patente europea 258.017, solicitud de patente europea 237.362; solicitud de patente europea 201.184; patentes estadounidenses 4.683.202; 4.582.788 y 4.683.194).

ii. Resistencia a exonucleasa

Otros métodos que pueden emplearse para determinar la identidad de un nucleótido presente en un sitio polimórfico utilizan un derivado de nucleótido resistente a exonucleasa especializado (patente estadounidense 4.656.127). Se hibrida un cebador complementario a una secuencia alélica inmediatamente en sentido 3' con respecto al sitio polimórfico con el ADN en investigación. Si el sitio polimórfico en el ADN contiene un nucleótido que es complementario al derivado de nucleótido resistente a exonucleasa particular presente, entonces una polimerasa incorporará ese derivado

en el extremo del cebador hibridado. Tal incorporación hace que el cebador sea resistente a la escisión por exonucleasa y permite de ese modo su detección. Puesto que se conoce la identidad del derivado resistente a exonucleasa, puede determinarse el nucleótido específico presente en el sitio polimórfico del ADN.

5 iii. *Métodos de microsecuenciación*

Se han descrito otros diversos procedimientos de incorporación de nucleótidos guiados por cebador para someter a ensayo sitios polimórficos en ADN (Komher *et al.*, 1989; Sokolov, 1990; Syvanen 1990; Kuppuswamy *et al.*, 1991; Prezant *et al.*, 1992; Ugozzoli *et al.*, 1992; Nyren *et al.*, 1993). Estos métodos se basan en la incorporación de desoxinucleótidos marcados para diferenciar entre bases en un sitio polimórfico. Puesto que la señal es proporcional al número de desoxinucleótidos incorporados, los polimorfismos que se producen en series del mismo nucleótido dan como resultado una señal que es proporcional a la longitud de la serie (Syvanen *et al.*, 1990).

15 iv. *Extensión en disolución*

La patente francesa 2.650.840 y la solicitud PCT WO91/02087 tratan un método basado en disolución para determinar la identidad del nucleótido de un sitio polimórfico. Según estos métodos, se usa un cebador complementario a secuencias alélicas inmediatamente en sentido 3' con respecto a un sitio polimórfico. La identidad del nucleótido de ese sitio se determina usando derivados de desoxinucleótidos marcados que se incorporan en el extremo del cebador si es complementario al nucleótido del sitio polimórfico.

20 v. *Análisis de fragmentos genéticos o extensión en fase sólida*

La solicitud PCT WO92/15712 describe un método que usa mezclas de terminadores marcados y un cebador que es complementario a la secuencia en sentido 3' con respecto a un sitio polimórfico. El terminador marcado que se incorpora es complementario al nucleótido presente en el sitio polimórfico de la molécula diana que se evalúa y por tanto se identifica. En este caso el cebador o la molécula diana se inmoviliza en una fase sólida.

30 vi. *Ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA)*

Este es otro método en fase sólida que usa una metodología diferente (Landegren *et al.*, 1988). Se usan dos oligonucleótidos que pueden hibridar con secuencias colindantes de una cadena sencilla de un ADN diana. Uno de estos oligonucleótidos está biotinilado mientras que el otro está marcado de manera detectable. Si se encuentra la secuencia complementaria precisa en una molécula diana, los oligonucleótidos hibridarán de manera que sus extremos terminales están en contacto y crean un sustrato de ligación. La ligación permite la recuperación del oligonucleótido marcado usando avidina. También se han descrito otros ensayos de detección de ácidos nucleicos, basándose en este método, combinados con PCR (Nickerson *et al.*, 1990). En este caso se usa PCR para conseguir la amplificación exponencial del ADN diana, que entonces se detecta usando el OLA.

40 vii. *Análisis de fragmentos genéticos mediado por ligasa/polimerasa*

La patente estadounidense 5.952.174 describe un método que también implica dos cebadores que pueden hibridar con secuencias colindantes de una molécula diana. El producto hibridado se forma en un soporte sólido en el que se inmoviliza la diana. En este caso la hibridación se produce de manera que los cebadores se separan uno de otro por un espacio de un solo nucleótido. La incubación de este producto hibridado en presencia de una polimerasa, una ligasa y una mezcla de nucleósidos trifosfato conteniendo al menos un desoxinucleósido trifosfato permite la ligación de cualquier par de oligonucleótidos hibridados colindantes. La adición de una ligasa da como resultado dos acontecimientos requeridos para generar una señal, extensión y ligación. Esto proporciona una especificidad mayor y un "ruido" menor que los métodos que usan o bien extensión o bien ligación solas y a diferencia de los ensayos basados en polimerasa, este método potencia la especificidad de la etapa de polimerasa combinándola con una segunda hibridación y una etapa de ligación para una señal que va a unirse a la fase sólida.

50 viii. *Reacciones de escisión invasiva*

Pueden usarse reacciones de escisión invasiva para evaluar ADN celular para un polimorfismo particular. Una tecnología denominada INVADER® emplea tales reacciones (por ejemplo, de Arruda *et al.*, 2002; Stevens *et al.*, 2003). En general, existen tres moléculas de ácido nucleico: 1) un oligonucleótido en el sentido de 5' del sitio diana ("oligonucleótido en el sentido de 5'"), 2) un oligonucleótido de sonda que cubre el sitio diana ("sonda") y 3) un ADN monocatenario con el sitio diana ("diana"). El oligonucleótido en el sentido de 5' y la sonda no se solapan sino que contienen secuencias contiguas. La sonda contiene un fluoróforo donador, tal como fluoresceína, y un colorante aceptor, tal como Dabcyl. El nucleótido en el extremo 3' terminal del oligonucleótido en el sentido de 5' solapa ("invade") el primer par de bases de un dúplex de sonda-diana. Entonces la sonda se escinde por una nucleasa en 5' específica de estructura provocando la separación del par de fluoróforo/agente de extinción, lo que aumenta la cantidad de fluorescencia que puede detectarse. Véase Lu *et al.*, 2004.

En algunos casos, el ensayo se realiza en una superficie sólida o en un formato de matriz.

ix. Otros métodos para detectar SNP

Otros diversos métodos específicos para la detección e identificación de polimorfismos se presentan a continuación y pueden usarse como tal o con modificaciones adecuadas junto con la identificación de polimorfismos del gen β_1 AR en la presente invención. También se describen otros diversos métodos en el sitio web de SNP del NCBI en World Wide Web en ncbi.nlm.nih.gov/SNP.

En una realización particular, pueden determinarse haplotipos extendidos en cualquier locus dado en una población, lo que permite identificar exactamente cuáles de los SNP serán redundantes y cuáles serán esenciales en estudios de asociación. El último se denomina “los SNP con etiqueta de haplotipo (htSNP)”, marcadores que capturan los haplotipos de un gen o una región de desequilibrio de enlace. Véase Johnson *et al.* (2001) y Ke y Cardon (2003), para métodos a modo de ejemplo.

El ensayo de VDA utiliza amplificación por PCR de segmentos genómicos mediante métodos de PCR prolongada que usan reactivos LA Taq de TaKaRa y otras condiciones de reacción convencionales. La amplificación prolongada puede amplificar tamaños de ADN de aproximadamente 2.000-12.000 pb. La hibridación de los productos con una matriz detectora de variante (VDA) puede realizarse mediante un centro de cribado de alta productividad de Affymetrix y analizarse con software informático.

Un método denominado ensayo de Chip usa amplificación por PCR de segmentos genómicos mediante protocolos de PCR prolongada o convencional. Los productos de hibridación se analizan mediante VDA, Halushka *et al.* (1999). Los SNP se clasifican generalmente como “seguros” o “probables” basándose en análisis por ordenador de los patrones de hibridación. Mediante comparación con métodos de detección alternativos tales como secuenciación de nucleótidos, se han confirmado los SNP “seguros” en el 100% de las veces; y se han confirmado los SNP “probables” en el 73% de las veces mediante este método.

Otros métodos implican simplemente la amplificación por PCR tras digestión con la enzima de restricción apropiada. Todavía otros implican la secuenciación de productos de PCR purificados a partir de regiones genómicas conocidas.

Todavía en otro método, se amplifican por PCR exones individuales o fragmentos solapantes de exones grandes. Se diseñan cebadores a partir de secuencias de bases de datos o publicadas y se realiza la amplificación por PCR del ADN genómico usando las siguientes condiciones: 200 ng de molde de ADN, 0,5 μ M de cada cebador, 80 μ M de cada uno de dCTP, dATP, dTTP y dGTP, formamida al 5%, $MgCl_2$ 1,5 mM, 0,5 U de Taq polimerasa y 0,1 volumen del tampón Taq. Se realiza la ciclación térmica y se analizan los productos de PCR resultantes mediante análisis de PCR-polimorfismo conformacional monocatenario (PCR-SSCP), en una variedad de condiciones, por ejemplo, gel de poliacrilamida al 5 ó 10% con urea al 15%, con o sin glicerol al 5%. Se realiza la electroforesis durante la noche. Los productos de PCR que muestran desplazamientos de movilidad se vuelven a amplificar y se secuencian para identificar la variación de nucleótidos.

En un método denominado CGAP-GAI (DEMIGLACE), se cargan en una memoria datos de alineación y secuencias (de un archivo PHRAP.ace), puntuaciones de calidad para las llamadas a bases de secuencia (de archivos de calidad de PHRED), información de distancia (de programas vecinos y dnadist de PHYLIP) y datos de llamada a bases (de conmutación ‘-d’ de PHRED). Las secuencias se alinean y examinan para cada trozo vertical (“corte”) del ensamblaje resultante para determinar la disconformidad. Cualquier corte de este tipo se considera un SNP candidato (DEMIGLACE). Se usan una serie de filtros por DEMIGLACE para eliminar cortes que es probable que no representen polimorfismos verdaderos. Éstos incluyen filtros que: (i) excluyen secuencias en cualquier corte dado de una consideración de SNP en la que las puntuaciones de calidad de secuencias vecinas caen en un 40% o más; (ii) excluyen llamadas en las que la amplitud del pico está por debajo del percentil décimo quinto de todas las llamadas a bases para ese tipo de nucleótidos; (iii) descalifica regiones de una secuencia que tienen un alto número de disconformidades con el consenso de participar en los cálculos de SNP; (iv) elimina de consideración cualquier llamada a bases con una llamada alternativa en la que el pico ocupa el 25% o más del área del pico llamado; (v) excluye variaciones que se producen en sólo una dirección de lectura. Las puntuaciones de calidad de PHRED se convirtieron en valores de probabilidad de error para cada nucleótido en el corte. Se usan métodos bayesianos convencionales para calcular la posterior probabilidad de que exista evidencia de heterogeneidad de nucleótidos en una ubicación dada.

En un método denominado CU-RDF (RESEQ), se realiza amplificación por PCR de ADN aislado a partir de sangre usando cebadores específicos para cada SNP, y tras protocolos de limpieza típicos para eliminar cebadores no usados y nucleótidos libres, secuenciación directa usando los mismos cebadores o anidados.

En un método denominado DEBNICK (MÉTODO-B), se realiza un análisis comparativo de secuencias ETS agrupadas y se confirma mediante secuenciación de ADN basada en fluorescencia. En un método relacionado, denominado DEBNICK (MÉTODO-C), se realiza un análisis comparativo de secuencias ETS agrupadas con calidad de phred > 20 en el sitio del apareamiento erróneo, calidad de phred promedio ≥ 20 más de 5 bases en 5'-FLANK y 3' con respecto al SNP, sin apareamientos erróneos en 5 bases en sentido de 5' y 3' con respecto al SNP, al menos dos apariciones de cada alelo y se confirma examinando trazas.

En un método identificado mediante ERO (RESEQ), se diseñan nuevos conjuntos de cebadores para los STS publicados electrónicamente y se usan para amplificar ADN a partir de 10 cepas de ratón diferentes. Entonces, se purifica en gel el producto de amplificación de cada cepa y se secuencian usando una técnica de secuenciación de ciclo, de dideoxilo convencional con terminadores marcados con ³³P. Entonces se cargan todas las reacciones terminadas con ddATP en carriles adyacentes de un gel de secuenciación seguidas por todas las reacciones con ddGTP, etc. Los SNP se identifican explorando visualmente las radiografías.

En otro método identificado como ERO (RESEQ-HT), se diseñan nuevos conjuntos de cebadores para secuencias de ADN murino publicadas electrónicamente y se usan para amplificar ADN a partir de 10 cepas de ratón diferentes. El producto de amplificación de cada cepa se prepara para secuenciación tratándose con exonucleasa I y fosfatasa alcalina de gamba. Se realiza la secuenciación usando el kit de reacción ABI Prism Big Dye Terminator Ready (Perkin-Elmer) y se ejecutan las muestras de secuencia en el analizador de ADN 3700 (secuenciador de 96 capilares).

FGU-CBT (SCA2-SNP) identifica un método en el que la región que contenía el SNP se amplificó por PCR usando los cebadores SCA2-FP3 y SCA2-RP3. Aproximadamente 100 ng de ADN genómico se amplifican en un volumen de reacción de 50 µl que contiene una concentración final de Tris 5 mM, KCl 25 mM, MgCl₂ 0,75 mM, gelatina al 0,05%, 20 pmol de cada cebador y 0,5 U de Taq ADN polimerasa. Las muestras se desnaturalizan, aparean y extienden y el producto de PCR se purifica a partir de una banda cortada del gel de agarosa usando, por ejemplo, el kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen) y se secuencian usando la química de terminador de colorante en un secuenciador de ADN automatizado ABI Prism 377 con los cebadores de PCR.

En un método identificado como JBLACK (SEQ/RESTRICT), se realizan dos reacciones de PCR independientes con ADN genómico. Los productos de la primera reacción se analizan mediante secuenciación, indicando un sitio de restricción FspI único. La mutación se confirma en el producto de la segunda reacción de PCR mediante la digestión con Fsp I.

En un método descrito como KWOK(1), se identifican los SNP comparando datos de secuencias genómicas de alta calidad de cuatro individuos elegidos aleatoriamente mediante secuenciación de ADN directa de los productos de PCR con química de terminador dye (véase Kwok *et al.*, 1996). En un método relacionado identificado como KWOK(2) se identifican los SNP comparando datos de secuencias genómicas de alta calidad de clones de gran inserto solapantes tales como cromosomas artificiales bacterianos (BAC) o cromosomas artificiales basados en P1 (PAC). Entonces se desarrolla un STS que contiene este SNP y se confirma la existencia del SNP en diversas poblaciones mediante secuenciación de ADN reunido (véase Taillon-Miller *et al.*, 1998). En otro método similar denominado KWOK(3), se identifican los SNP comparando datos de secuencias genómicas de alta calidad de los clones de gran inserto solapantes BAC o PAC. Los SNP encontrados mediante este enfoque representan variaciones de secuencias de ADN entre los dos cromosomas donadores pero todavía no se han determinado las frecuencias de alelo en la población general. En el método KWOK(5), se identifican los SNP comparando datos de secuencias genómicas de alta calidad de una muestra de ADN homocigoto y una o más muestras de ADN reunido mediante secuenciación de ADN directa de los productos de PCR con química de terminador dye. Los STS usados se desarrollan a partir de datos de secuencias encontrados en bases de datos disponibles al público. Específicamente, estos STS se amplifican mediante PCR frente a una mola hidatiforme completa (CHM) que se ha demostrado que es homocigota en todos los loci y un conjunto de muestras de ADN de 80 antecesores de CEPH (véase Kwok *et al.*, 1994).

En otro método de este tipo, KWOK (OverlapSnpDetectionWithPolyBayes), se descubren los SNP mediante análisis en ordenador automatizado de regiones solapantes de secuencias de clones genómicos humanos de gran inserto. Para la adquisición de los datos, se obtienen las secuencias de clones directamente de centros de secuenciación a gran escala. Esto es necesario debido a que secuencias de calidad de base no están presentes/disponibles a través de GenBank. El procesamiento de datos sin procesar implica el análisis de secuencias de clones e información de calidad de base adjunta para determinar la coherencia. Las secuencias terminadas ("base perfecta", tasa de error inferior a 1 en 10.000 pb) con ninguna secuencia de calidad de base asociada se asignan un valor de calidad de base uniforme de 40 (tasa de error de 1 en 10.000 pb). Se rechazan secuencias borradas sin valores de calidad de base. Las secuencias procesadas se introducen en una base de datos local. También se almacena una versión de cada secuencia con repeticiones humanas conocidas enmascaradas. Se realiza el enmascaramiento de repeticiones con el programa "MASKERAID". Detección de solapamiento: se detectan solapamientos putativos con el programa "WUBLAST". Varias etapas de filtrado seguidas con el fin de eliminar resultados de detección de solapamientos falsos, es decir similitudes entre un par de secuencias de clones que surgen debido a duplicación de secuencias en oposición a un solapamiento verdadero. La longitud total de solapamiento, la similitud en porcentaje global, el número de diferencias de secuencia entre nucleótidos con valor de calidad de base alta "apareamientos erróneos de alta calidad". Los resultados también se comparan con los resultados de la cartografía de fragmentos de restricción de clones genómicos en el Centro de secuenciación de genoma de la Universidad de Washington, los informes del clasificador sobre solapamientos, y los resultados del cóntigo de secuencia que fortalece el esfuerzo en el NCBI. Detección de SNP: los pares solapantes de una secuencia de clones se analizan para determinar sitios de SNP candidatos con el software de detección de SNP "POLYBAYES". Las diferencias de secuencia entre el par de secuencias se califican para la probabilidad de representar una variación de secuencia verdadera en oposición a un error de secuenciación. Este proceso requiere la presencia de valores de calidad de base para ambas secuencias. Se extraen candidatos con alta calificación. Se limita la búsqueda a variaciones de un solo par de bases de tipo sustitución. Se calcula la calificación de confianza de un SNP candidato mediante el software POLYBAYES.

En un método identificado mediante KWOK (ensayo de TaqMan), el ensayo de TaqMan se usa para determinar genotipos de 90 individuos aleatorios. En un método identificado mediante KYUGEN(Q1), muestras de ADN de poblaciones indicadas se reúnen y analizan mediante PLACE-SSCP. Las alturas de los picos de cada alelo en el análisis reunido se corrigen mediante aquéllas en un heterocigoto, y se usan posteriormente para el cálculo de las frecuencias de alelo. Las frecuencias de alelo superiores al 10% se cuantifican de manera fiable mediante este método. Una frecuencia alélica = 0 (cero) significa que se encontró el alelo entre los individuos, pero el pico correspondiente no se observa en el examen del conjunto. Una frecuencia alélica = 0-0,1 indica que se detectan alelos menores en el conjunto pero los picos son demasiado bajos para que se cuantifique de manera fiable.

Todavía en otro método identificado como KYUGEN (Método 1), los productos de PCR se marcan posteriormente con colorantes fluorescentes y se analizan mediante un sistema de electroforesis capilar automatizado en condiciones de SSCP (PLACE-SSCP). Cuatro o más ADN de individuos se analizan con o sin dos ADN reunido (conjunto japonés y conjunto de antecesores de CEPH) en una serie de experimentos. Se identifican los alelos mediante inspección visual. Se secuencian los ADN de individuos con genotipos diferentes y se identifican los SNP. Se estiman las frecuencias de alelo a partir de las alturas de los picos en las muestras reunidas tras la corrección del sesgo de señal usando las alturas de los picos en heterocigotos. Para los cebadores de PCR se etiquetan para que tengan 5'-ATT o 5'-GTT en sus extremos para el marcaje posterior de ambas cadenas. Se amplifican muestras de ADN (10 ng/ μ l) en mezclas de reacción que contienen el tampón (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3 ó 9,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 2,0 mM), 0,25 μ M de cada cebador, 200 μ M de cada dNTP, y 0,025 unidades/ μ l de Taq ADN polimerasa mezclada previamente con anticuerpo anti-Taq. Las dos cadenas de los productos de PCR se marcan de manera diferente con nucleótidos modificados con R110 y R6G mediante una reacción de intercambio de fragmento de Klenow de ADN polimerasa I. La reacción se detiene añadiendo EDTA, y los nucleótidos no incorporados se desfosforilan añadiendo fosfatasa alcalina intestinal de ternero. Para la SSCP: una alícuota de productos de PCR marcados con fluorescencia y marcadores internos marcados con TAMRA se añaden a formamida desionizada, y se desnaturalizan. Se realiza la electroforesis en un capilar usando un analizador genético ABI Prism 310. Se usan los software de Genescan (P-E Biosystems) para la recolección de datos y el procesamiento de datos. El ADN de individuos (de dos a once) incluyendo los que mostraban genotipos diferentes en SSCP se someten a secuenciación directa usando química de terminador big-dye, en secuenciadores ABI Prism 310. Múltiples archivos de seguimiento de secuencia obtenidos del aparato ABI Prism 310 se procesan y alinean mediante Phred/Phrap y se observan usando visualizador Consed. Los SNP se identifican mediante software PolyPhred e inspección visual.

Todavía en otro método identificado como KYUGEN (Método 2), individuos con genotipos diferentes se investigan mediante HPLC desnaturalizante (DHPLC) o PLACE-SSCP (Inazuka *et al.*, 1997) y se determinan sus secuencias para identificar los SNP. Se realiza la PCR con cebadores etiquetados con 5'-ATT o 5'-GTT en sus extremos para el marcaje posterior de ambas cadenas. Se lleva a cabo el análisis por DHPLC usando el sistema de análisis de fragmentos de ADN WAVE (Transgenomic). Se inyectan los productos de PCR en una columna DNASep, y se separan en las condiciones determinadas usando el programa WAVEMaker (Transgenomic). Las dos cadenas de los productos de PCR se marcan de manera diferente con nucleótidos modificados con R110 y R6G mediante una reacción de intercambio de fragmento de Klenow de ADN polimerasa I. La reacción se detiene añadiendo EDTA, y los nucleótidos no incorporados se desfosforilan añadiendo fosfatasa alcalina intestinal de ternero. Se realiza SSCP seguido por electroforesis en un capilar usando un analizador genético ABI Prism 310. Software de Genescan (P-E Biosystems). El ADN de los individuos incluyendo aquéllos que mostraban genotipos diferentes en DHPLC o SSCP se someten a secuenciación directa usando química de terminador big-dye, en un secuenciador ABI Prism 310. Múltiples archivos de seguimiento de secuencia obtenidos del aparato ABI Prism 310 se procesan y alinean mediante Phred/Phrap y se observan usando un visualizador Consed. Los SNP se identifican mediante software PolyPhred e inspección visual. Los datos de cromatograma de seguimiento de secuencias EST en Unigene se procesan con PHRED. Para identificar los SNP probables, se notifican apareamientos erróneos de una sola base a partir de múltiples alineamientos de secuencias producidos por los programas PHRAP, BRO y POA para cada agrupamiento de Unigene. BRO corregía posibles orientaciones EST notificadas erróneamente, mientras que POA identificaba y analizaba estructuras de alineación no lineales indicativas de mezclado/quimeras de genes que pueden producir los SNP espurios. Se usa la interferencia bayesiana para sopesar la evidencia de un polimorfismo verdadero frente a un error de secuenciación, alineación errónea o ambigüedad, secuencias EST quiméricas o de agrupamiento erróneo, datos de evaluación tales como altura, nitidez, solapamiento y separación del cromatograma sin procesar; tasas de error de secuenciación; sensibilidad en contexto; origen de la biblioteca de ADNc, etc.

En un método identificado como MARSHFIELD (Método-B), secuencias de ADN humano solapantes que contenían polimorfismos de inserción/delección putativos se identifican a través de búsquedas de bases de datos públicas. Los cebadores de PCR que flanqueaban cada sitio polimórfico se seleccionan de las secuencias consenso. Se usan cebadores para amplificar ADN genómico humano individual o reunido. Los productos de PCR resultantes se resuelven en un gel de poliacrilamida desnaturalizante y se usa un PhosphorImager para estimar las frecuencias de alelo de los conjuntos de ADN.

f. Desequilibrio de enlace

Polimorfismos en desequilibrio de enlace con otro polimorfismo en el que la identificación de un polimorfismo es predictivo de la identidad del polimorfismo enlazado. "Desequilibrio de enlace" ("LD" tal como se usa en el presente documento, aunque también denominado "LED" en la técnica) se refiere a una situación en la que una combinación particular de alelos (es decir, una forma variante de un gen dado) o polimorfismos en dos loci aparece con mayor

frecuencia de lo que se esperaría por el azar. “Significativo” tal como se usa con respecto a desequilibrio de enlace; tal como se determina por un experto en la técnica, se contempla que es un valor p o α estadístico que puede ser 0,25 ó 0,1 y puede ser 0,1, 0,05, 0,001, 0,00001 o menos. El polimorfismo en la posición 389 en la proteína de β_1 AR puede determinarse evaluando la secuencia de ácido nucleico de un polimorfismo en desequilibrio de enlace con el polimorfismo 389. La invención puede implementarse de esta manera con respecto a uno o más polimorfismos de manera que se permita el análisis de haplotipo. “Haplotipo” se usa según su significado simple y común para un experto en la técnica. Se refiere a un genotipo colectivo de dos o más alelos o polimorfismos a lo largo de uno de los cromosomas homólogos.

10 B. Evaluación de la proteína

Alternativamente, puede determinarse la variación polimórfica mediante cualquier método que detecta una variación de aminoácido en la posición 389 de la proteína de β_1 AR. La invención no debe limitarse mediante ningún método para conseguir esto. Por ejemplo, puede obtenerse una muestra de fluido o tejido de un individuo y se determina el aminoácido en la posición 389 de la proteína de β_1 AR. Tal detección puede ser mediante diversos métodos incluyendo ensayos basados en anticuerpos, (inmunotransferencias de tipo Western, ELISA) o puede usarse análisis de aminoácidos (cromatografía de líquidos de alta resolución o espectroscopía de masas) que detectará si la proteína tiene Arg o Gly.

Por tanto, en ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden al menos uno molécula proteica, tal como una proteína de β_1 AR o una proteína que se une a la proteína de β_1 AR, tal como un anticuerpo. Tal como se usa en el presente documento, una “molécula proteica”, “composición proteica”, “compuesto proteico”, “cadena proteica” o “material proteico” generalmente se refiere, pero no se limita a, una proteína superior a aproximadamente 200 aminoácidos o la secuencia endógena de longitud completa traducida a partir de un gen; un polipéptido superior a aproximadamente 100 aminoácidos; y/o un péptido de desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 100 aminoácidos. Todos los términos “proteico” descritos anteriormente pueden usarse de manera intercambiable en el presente documento.

Las composiciones proteicas pueden prepararse mediante cualquier técnica conocida para los expertos en la técnica, incluyendo la expresión de proteínas, polipéptidos o péptidos a través de técnicas de biología molecular convencionales, el aislamiento de compuestos proteicos a partir de fuentes naturales, o la síntesis química de materiales proteicos. Se han dado a conocer previamente las secuencias de nucleótidos y proteína, polipéptido y péptido para diversos genes, y pueden encontrarse en bases de datos informatizadas conocidas para los expertos en la técnica. Una base de datos de este tipo son las bases de datos Genbank y GenPept del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las regiones codificantes para estos genes conocidos pueden amplificarse y/o expresarse usando las técnicas dadas a conocer en el presente documento o tal como conocerán los expertos en la técnica. Alternativamente, los expertos en la técnica conocen diversas preparaciones comerciales de proteínas, polipéptidos y péptidos.

1. Purificación de proteínas

Puede ser deseable purificar β_1 AR a partir de una muestra o purificar una proteína que se une a β_1 AR, tal como un anticuerpo. Tales técnicas se emplean ampliamente y la invención no pretende limitarse con respecto a la purificación de proteínas. Los expertos en la técnica conocen bien técnicas de purificación de proteínas. Estas técnicas implican, en un nivel, el fraccionamiento bruto del medio celular en fracciones de polipéptidos y no polipéptidos. Cuando se tiene separado el polipéptido de otras proteínas, el polipéptido de interés puede purificarse adicionalmente usando técnicas electroforéticas y cromatográficas para conseguir una purificación parcial o completa (o purificación hasta la homogeneidad). Métodos analíticos particularmente adecuados para la preparación de un péptido puro son cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión; electroforesis en gel de poliacrilamida; isoelectroenfoque. Un método particularmente eficaz de purificación de péptidos es cromatografía de líquidos de proteína rápida o incluso HPLC.

Ciertos aspectos de la presente invención pueden referirse a la purificación, y en realizaciones particulares, a la purificación sustancial, de una proteína o péptido codificado. La expresión “proteína o péptido purificado” tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a una composición, que puede aislarse a partir de otros componentes, en la que se purifica la proteína o el péptido hasta cualquier grado en relación a su estado que puede obtenerse de manera natural. Por tanto, una proteína o péptido purificado también se refiere a una proteína o péptido, libre del entorno en el que puede producirse de manera natural.

En general, “purificado” se referirá a una composición de proteína o péptido que se ha sometido a fraccionamiento para eliminar otros diversos componentes, y cuya composición retiene sustancialmente su actividad biológica expresada. Cuando se usa la expresión “sustancialmente purificado”, esta designación se referirá a una composición en la que la proteína o el péptido forma el componente principal de la composición, tal como constituyendo aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95% o más de las proteínas en la composición.

Los expertos en la técnica conocerán diversos métodos para cuantificar el grado de purificación de la proteína o el péptido a la luz de la presente descripción. Éstos incluyen, por ejemplo, determinar la actividad específica de una fracción activa, o evaluar la cantidad de polipéptidos dentro de una fracción mediante análisis por SDS/PAGE. Un mé-

todo preferido para evaluar la pureza de una fracción es calcular la actividad específica de la fracción, compararla con la actividad específica del extracto inicial, y por tanto calcular el grado de pureza, evaluado en el presente documento mediante un “número de purificación de -veces”. Las unidades reales usadas para representar la cantidad de actividad dependerán, por supuesto, de la técnica de ensayo particular elegida para seguir la purificación y de si la proteína o péptido expresado presenta o no una actividad detectable.

Los expertos en la técnica conocerán bien una variedad de técnicas adecuadas para su uso en la purificación de proteínas. Éstas incluyen, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, PEG, anticuerpos y similares o mediante desnaturalización térmica, seguida por centrifugación; etapas de cromatografía tales como cromatografía de intercambio iónico, de filtración en gel, en fase inversa, con hidroxilapatita y de afinidad; isoelectroenfoque; electroforesis en gel; y combinaciones de tales y otras técnicas. Tal como se conoce generalmente en la técnica, se cree que puede cambiarse el orden de realizar las diversas etapas de purificación, o que pueden omitirse ciertas etapas, y todavía dar como resultado un método adecuado para la preparación de una proteína o péptido sustancialmente purificado.

No existe ningún requisito general de que la proteína o el péptido siempre se proporcionen en su estado más purificado. En efecto, se contempla que productos menos sustancialmente purificados tendrán utilidad en ciertas realizaciones. Puede conseguirse la purificación parcial usando menos etapas de purificación en combinación, o utilizando diferentes formas del mismo esquema de purificación general. Por ejemplo, se aprecia que una cromatografía en columna de intercambio catiónico realizada utilizando un aparato de HPLC dará como resultado generalmente una mayor purificación de “-veces” que la misma técnica utilizando un sistema de cromatografía a baja presión. Los métodos que presentan un grado inferior de purificación relativa pueden tener ventajas en la recuperación total del producto proteico, o en mantener la actividad de una proteína expresada.

Se conoce que la migración de un polipéptido puede variar, algunas veces de manera significativa, con diferentes condiciones de SDS/PAGE (Capaldi *et al.*, 1977). Por tanto se apreciará que en condiciones de electroforesis que difieren, pueden variar los pesos moleculares aparentes de productos de expresión purificados o parcialmente purificados.

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) se caracteriza por una separación muy rápida con una resolución extraordinaria de picos. Esto se consigue mediante el uso de partículas muy finas y alta presión para mantener una velocidad de flujo adecuada. Puede conseguirse la separación en cuestión de minutos, o como máximo una hora. Además, se necesita sólo un volumen muy pequeño de la muestra debido a que las partículas son tan pequeñas y estrechamente empaquetadas que el volumen vacío es una fracción muy pequeña del volumen del lecho. Además, la concentración de la muestra no necesita ser muy grande puesto que las bandas son tan estrechas que existe muy poca dilución de la muestra.

La cromatografía en gel, o cromatografía de tamiz molecular, es un tipo especial de cromatografía de reparto que se basa en el tamaño molecular. La teoría tras la cromatografía en gel es que la columna, que se prepara con partículas diminutas de una sustancia inerte que contiene poros pequeños, separa moléculas más grandes de moléculas más pequeñas a medida que pasan a través de o alrededor de los poros, dependiendo de su tamaño. Siempre y cuando el material del que están preparadas las partículas no adsorba las moléculas, el único factor que determina la velocidad de flujo es el tamaño. Por tanto, las moléculas se eluyen de la columna en tamaño decreciente, siempre y cuando la forma sea relativamente constante. La cromatografía en gel es insuperable para separar moléculas de diferente tamaño debido a que la separación es independiente de todos los demás factores tales como pH, fuerza iónica, temperatura, etc. Tampoco existe prácticamente ninguna adsorción, menos propagación de zona y el volumen de elución está relacionado de manera simple con el peso molecular.

La cromatografía de afinidad es un procedimiento cromatográfico que se basa en la afinidad específica entre una sustancia que va a aislarse y una molécula que puede unirse específicamente a ésta. Esto es una interacción del tipo receptor-ligando. El material de la columna se sintetiza acoplado de manera covalente uno de los componentes de unión a una matriz insoluble. Entonces el material de la columna puede adsorber específicamente la sustancia desde la disolución. La elución se produce cambiando las condiciones a aquéllas en las que no se producirá la unión (por ejemplo, alterar el pH, fuerza iónica y temperatura).

Un tipo particular de cromatografía de afinidad útil en la purificación de compuestos que contienen hidratos de carbono es cromatografía de afinidad con lectina. Las lectinas son una clase de sustancias que se unen a una variedad de polisacáridos y glicoproteínas. Las lectinas habitualmente se acoplan a agarosa mediante bromuro de cianógeno. La conconavalina A acoplada a Sepharose fue el primer material de este tipo que se usó y se ha usado ampliamente en el aislamiento de polisacáridos y glicoproteínas. Otras lectinas que se han incluido son lectina de lenteja, aglutinina de germen de trigo que ha sido útil en la purificación de residuos de N-acetil glucosaminilo y lectina de *Helix pomatia*. Las propias lectinas se purifican usando cromatografía de afinidad con ligandos de hidrato de carbono. Se ha usado lactosa para purificar lectinas a partir de semilla de ricino y cacahuete; la maltosa ha sido útil en la extracción de lectinas de lentejas y judía jack; la N-acetil-D galactosamina se usa para purificar lectinas a partir de soja; la N-acetil glucosaminilo se une a las lectinas de germen de trigo; se ha usado D-galactosamina en la obtención de lectinas de almejas y L-fucosa se unirá a las lectinas de loto.

La matriz debe ser una sustancia que en sí misma no adsorba moléculas en ningún grado significativo y que tenga una amplia gama de estabilidad química, física y térmica. El ligando debe acoplarse de manera que no se vean

afectadas sus propiedades de unión. El ligando también debe proporcionar una unión relativamente estrecha. Y debe ser posible eluir la sustancia sin destruir la muestra o el ligando. Una de las formas más comunes de cromatografía de afinidad es la cromatografía de inmuoafinidad. La generación de anticuerpos que serán adecuados para su uso según la presente invención se trata a continuación.

2. Anticuerpos

Otra realización de la presente invención son anticuerpos, en algunos casos, un anticuerpo monoclonal humano inmunorreactivo con la secuencia de polipéptido de β_1 AR humano. Se entiende que pueden usarse anticuerpos para detectar β_1 AR, particularmente un β_1 AR que es el resultado de un polimorfismo particular. Se contempla que los anticuerpos particularmente útiles en el contexto de la presente invención son aquéllos que se unen de manera diferente a una proteína de β_1 AR con una Gly389 en comparación con una proteína de β_1 AR con una Arg389 de manera que se distinga entre las dos poblaciones.

Tal como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” pretende hacer referencia ampliamente a cualquier agente de unión inmunológico tal como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Generalmente, se prefieren IgG y/o IgM debido a que son los anticuerpos más comunes en la situación fisiológica y debido a que se preparan lo más fácilmente en un entorno de laboratorio.

El término “anticuerpo” se usa para referirse a cualquier molécula de tipo anticuerpo que tiene una región de unión a antígeno, e incluye fragmentos de anticuerpo tales como Fab', Fab, F(ab')₂, anticuerpos de un solo dominio (DAB), Fv, scFv (Fv de cadena única) y similares. Las técnicas para preparar y usar diversos fragmentos y constructos basados en anticuerpos se conocen bien en la técnica. Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos también se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow *et al.*, 1988).

a. Generación de anticuerpos

En ciertas realizaciones, la presente invención implica anticuerpos. Por ejemplo, puede usarse todo o parte de uno monoclonal en la determinación del aminoácido en la posición 389. Tal como se detalló anteriormente, además de los anticuerpos generados contra proteínas de longitud completa, también pueden generarse anticuerpos en respuesta a constructos más pequeños que comprenden regiones de núcleo epitópico, incluyendo epítopos de tipo natural y mutantes. Las técnicas para preparar y usar diversos fragmentos y constructos basados en anticuerpos se conocen bien en la técnica. Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos también se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, 1988).

Se reconoce que los anticuerpos monoclonales (los AcM) tienen ciertas ventajas, por ejemplo, reproducibilidad y producción a gran escala, y se prefiere generalmente su uso. Por tanto, la invención proporciona anticuerpos monoclonales de origen humano, murino, de mono, de rata, de hámster, de conejo e incluso de pollo.

Los métodos para generar anticuerpos monoclonales (AcM) generalmente comienzan en la misma línea que aquéllos para preparar anticuerpos policlonales. En resumen, puede prepararse un anticuerpo policlonal inmunizando un animal con una composición de polipéptido inmunogénica según la presente invención y extrayendo antiseros de ese animal inmunizado. Alternativamente, en algunas realizaciones de la presente invención, se extrae suero de personas que pueden haberse expuesto a un antígeno particular. La exposición a un antígeno particular puede producirse en un entorno de trabajo, de manera que aquellas personas se han expuesto de manera ocupacional a un antígeno particular y han desarrollado anticuerpos policlonales frente a un péptido, polipéptido, o proteína. En algunas realizaciones de la invención, se usa suero policlonal de personas expuestas de manera ocupacional para identificar regiones antigénicas en la toxina gelonina a través del uso de métodos de inmunodetección.

Puede usarse una amplia gama de especies animales para la producción de antiseros. Normalmente el animal usado para la producción de antiseros es un conejo, un ratón, una rata, un hámster, una cobaya o una cabra. Debido al volumen sanguíneo relativamente grande de los conejos, un conejo es una opción preferida para la producción de anticuerpos policlonales.

Tal como se conoce bien en la técnica, una composición dada puede variar en su inmunogenicidad. Por tanto es necesario a menudo reforzar el sistema inmunitario del huésped, tal como puede conseguirse acoplando un inmunógeno de polipéptido o péptido a un portador. Los portadores preferidos y a modo de ejemplo son hemocianina de lapa californiana (KLH) y albúmina de suero bovino (BSA). Otras albúminas tales como ovoalbúmina, albúmina de suero de ratón o albúmina de suero de conejo también pueden usarse como portadores. Los medios para conjugar un polipéptido a una proteína portadora se conocen bien en la técnica e incluyen glutaraldehído, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida, carbodiimida y bencidina bis-biazotizada.

También tal como se conoce bien en la técnica, la inmunogenicidad de una composición inmunogénica particular puede potenciarse mediante el uso de estimulantes no específicos de la respuesta inmunitaria, conocidos como adyuvantes. Las moléculas adyuvantes adecuadas incluyen todos los compuestos inmunoestimulantes aceptables, tales como citocinas, toxinas o composiciones sintéticas.

Los adyuvantes que pueden usarse incluyen IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, interferón γ , GMCSP, BCG, hidróxido de aluminio, compuestos MDP, tales como thur-MDP y nor-MDP, CGP (MTP-PE), lípido A, y monofosforil-lípido A (MPL). También se contempla RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, MPL, dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de pared celular (CWS) en una emulsión de escualeno al 2%/Tween 80. Incluso pueden usarse antígenos de MHC. Los adyuvantes a menudo preferidos, a modo de ejemplo, incluyen adyuvante completo de Freund (un estimulante no específico de la respuesta inmunitaria que contiene *Mycobacterium tuberculosis* muerto), adyuvante incompleto de Freund y adyuvante de hidróxido de aluminio.

Además de los adyuvantes, puede ser deseable coadministrar modificadores de la respuesta biológica (BRM), que se ha demostrado que regulan por incremento la inmunidad por células T o regulan por disminución la actividad de células supresoras. Tales BRM incluyen, pero no se limitan a, cimetidina (CIM; 1200 mg/d) (Smith/Kline, PA); ciclofosfamida a bajas dosis (CYP; 300 mg/m²) (Johnson/Mead, NJ), citocinas tales como interferón γ , IL-2 o IL-12 o genes que codifican para proteínas implicadas en funciones auxiliares inmunitarias, tales como B-7.

La cantidad de composición inmunógena usada en la producción de anticuerpos policlonales varía con la naturaleza del inmunógeno así como el animal usado para la inmunización. Puede usarse una variedad de vías para administrar el inmunógeno (subcutánea, intramuscular, intradérmica, intravenosa e intraperitoneal). La producción de anticuerpos policlonales puede monitorizarse extrayendo muestras de sangre del animal inmunizado en diversos puntos tras la inmunización.

También puede administrarse una segunda inyección de refuerzo. El proceso de refuerzo y titulación se repite hasta que se alcanza un título adecuado. Cuando se obtiene un nivel deseable de inmunogenicidad, puede extraerse la sangre del animal inmunizado y aislarse y almacenarse el suero, y/o puede usarse el animal para generar los AcM.

Los AcM pueden prepararse fácilmente a través del uso de técnicas bien conocidas, tales como las mostradas a modo de ejemplo en la patente estadounidense 4.196.265. Normalmente, esta técnica implica inmunizar un animal adecuado con una composición inmunogénica seleccionada, por ejemplo, un polipéptido, péptido o dominio purificado o parcialmente purificado, que es una composición de tipo natural o mutante. La composición de inmunización se administra de manera eficaz para estimular células productoras de anticuerpos.

Los AcM pueden purificarse adicionalmente, si se desea, usando filtración, centrifugación y diversos métodos cromatográficos tales como HPLC o cromatografía de afinidad. Los fragmentos de los anticuerpos monoclonales de la invención pueden obtenerse de los anticuerpos monoclonales producidos así mediante métodos que incluyen digestión con enzimas, tales como pepsina o papaina, y/o mediante escisión de enlaces disulfuro mediante reducción química. Alternativamente, los fragmentos de anticuerpos monoclonales abarcados por la presente invención pueden sintetizarse usando un sintetizador de péptidos automatizado.

También se contempla que un enfoque de clonación molecular puede usarse para generar AcM. Para esto, se preparan bibliotecas de fagémidos de inmunoglobulina combinatorias a partir de ARN aislado del bazo del animal inmunizado, y se seleccionan fagémidos que expresan anticuerpos apropiados cribado usando células que expresan el antígeno y células control. Las ventajas de este enfoque con respecto a las técnicas de hibridoma convencionales son que pueden producirse aproximadamente 10⁴ veces de anticuerpos y cribarse en una sola ronda, y que se generan nuevas especificidades mediante la combinación de las cadenas H y L, lo que aumenta adicionalmente la posibilidad de hallar anticuerpos apropiados.

b. Métodos de inmunodetección

Tal como se trata, en algunas realizaciones, la presente invención se refiere a métodos de inmunodetección para unir, purificar, eliminar, determinar y/o detectar de otro modo componentes biológicos tales como regiones antigénicas en polipéptidos y péptidos. Los métodos de inmunodetección de la presente invención pueden usarse para identificar regiones antigénicas de un péptido, polipéptido o proteína que tiene implicaciones terapéuticas, particularmente en la reducción de la inmunogenicidad o antigenicidad del péptido, polipéptido o proteína en un sujeto objetivo.

Los métodos de inmunodetección incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoanálisis (RIA), ensayo inmunorradiométrico, fluoroinmunoensayo, ensayo de quimiluminiscencia, ensayo de bioluminiscencia e inmunotransferencia de tipo Western, aunque los expertos conocen bien otros diversos métodos. Las etapas de diversos métodos de inmunodetección útiles se han descrito en la bibliografía científica, tal como, por ejemplo, Doolittle *et al.*, 1999; Gulbis *et al.*, 1993; De Jager *et al.*, 1993; y Nakamura *et al.*, 1987.

En general, los métodos de inmunounión incluyen obtener una muestra que se sospecha que contiene una proteína, polipéptido y/o péptido, y poner en contacto la muestra con un primer anticuerpo, monoclonal o policlonal, según la presente invención, como puede ser el caso, en condiciones eficaces para permitir la formación de inmunocomplejos.

Estos métodos incluyen métodos para purificar una proteína, polipéptido y/o péptido a partir de muestras de orgánulos, células, tejidos u organismos. En estos casos, el anticuerpo elimina el componente antigénico de proteína, polipéptido y/o péptido de una muestra. El anticuerpo preferiblemente se unirá a un soporte sólido, tal como en forma de una matriz de columna, y la muestra que se sospecha que contiene el componente antigénico de proteína, polipép-

tido y/o péptido se aplicará al anticuerpo inmovilizado. Los componentes no deseables se eliminarán por lavado de la columna, dejando al antígeno inmunocomplejado al anticuerpo inmovilizado que va a eluirse.

Los métodos de inmunounión también incluyen métodos para detectar y cuantificar la cantidad de un componente antigénico en una muestra y la detección y cuantificación de cualquier inmunocomplejo formado durante el proceso de unión. En este caso, se obtendrá una muestra que se sospecha que contiene un antígeno o dominio antigénico, y se pondrá en contacto la muestra con un anticuerpo frente al antígeno o dominio antigénico, y entonces se detectará y cuantificará la cantidad de inmunocomplejos formados en las condiciones específicas.

En términos de detección de antígenos, la muestra biológica analizada puede ser cualquier muestra que se sospecha que contiene un antígeno o dominio antigénico, tal como, por ejemplo, una muestra o sección de tejido, un extracto de tejido homogeneizado, una célula, un orgánulo, formas separadas y/o purificadas de cualquiera de las composiciones que contienen antígeno anteriores, o incluso cualquier fluido biológico que entra en contacto con la célula o el tejido, incluyendo sangre y/o suero.

Poner en contacto la muestra biológica elegida con el anticuerpo en condiciones eficaces y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de inmunocomplejos (inmunocomplejos primarios) es generalmente una cuestión de añadir simplemente la composición de anticuerpo a la muestra e incubar la mezcla durante un periodo de tiempo lo suficientemente prolongado para que los anticuerpos formen inmunocomplejos con, es decir, se unan a, cualquier antígeno presente. Tras este tiempo, la composición de muestra-anticuerpo, tal como una sección de tejido, placa de ELISA, inmuotransferencia de puntos o inmuotransferencia de tipo Western, se lavará generalmente para eliminar cualquier especie de anticuerpo unida de manera no específica, permitiendo que se detecten sólo aquellos anticuerpos unidos de manera específica dentro de los inmunocomplejos primarios.

En general, la detección de la formación de inmunocomplejos se conoce bien en la técnica y puede conseguirse a través de la aplicación de numerosos enfoques. Estos métodos se basan generalmente en la detección de una etiqueta o marcador, tal como cualquiera de estas etiquetas radioactivas, fluorescentes, biológicas y enzimáticas. Las patentes estadounidenses que se refieren al uso de tales marcadores incluyen 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 y 4.366.241. Por supuesto, se pueden encontrar ventajas adicionales a través del uso de un ligando de unión secundario tal como un segundo anticuerpo y/o una disposición de unión de ligando de biotina/avidina, tal como se conoce en la técnica.

El anticuerpo empleado en la detección puede unirse en sí mismo a un marcador detectable, en lo que entonces se detectará simplemente este marcador, permitiendo de ese modo que se determine la cantidad de los inmunocomplejos primarios en la composición. Alternativamente, puede detectarse el primer anticuerpo que llega a unirse dentro los inmunocomplejos primarios por medio de un segundo ligando de unión que tiene afinidad de unión por el anticuerpo. En estos casos, el segundo ligando de unión puede unirse a un marcador detectable. El segundo ligando de unión es en sí mismo a menudo un anticuerpo, que por tanto puede denominarse un anticuerpo "secundario". Los inmunocomplejos primarios se ponen en contacto con el ligando de unión secundario, marcado, o anticuerpo, en condiciones eficaces y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de inmunocomplejos secundarios. Los inmunocomplejos secundarios entonces se lavan generalmente para eliminar cualquier ligando o anticuerpo secundario marcado unido de manera no específica, y entonces se detecta el marcador restante en los inmunocomplejos secundarios.

Los métodos adicionales incluyen la detección de inmunocomplejos primarios mediante un enfoque de dos etapas. Un ligando de unión secundario, tal como un anticuerpo, que tiene afinidad de unión por el anticuerpo se usa para formar inmunocomplejos secundarios, tal como se describió anteriormente. Tras el lavado, los inmunocomplejos secundarios se ponen en contacto con un tercer anticuerpo o ligando de unión que tiene afinidad de unión por el segundo anticuerpo, de nuevo en condiciones eficaces y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de inmunocomplejos (inmunocomplejos terciarios). El tercer ligando o anticuerpo se une a un marcador detectable, permitiendo la detección de los inmunocomplejos terciarios así formados. Este sistema puede proporcionar amplificación de señales si se desea.

Un método de inmunodetección diseñado por Charles Cantor usa dos anticuerpos diferentes. Un anticuerpo monoclonal o policlonal, biotinilado de primera etapa se usa para detectar el/los antígenos diana, y un anticuerpo de segunda etapa se usa después para detectar la biotina unida a la biotina complejada. En ese método la muestra que va someterse a prueba se incuba en primer lugar en una disolución que contiene el anticuerpo de primera etapa. Si está presente el antígeno diana, algo del anticuerpo se une al antígeno para formar un complejo anticuerpo/antígeno biotinilado. Entonces se amplifica el complejo anticuerpo/antígeno mediante incubación en disoluciones sucesivas de estreptavidina (o avidina), ADN biotinilado y/o ADN biotinilado complementario, añadiendo cada etapa sitios de biotina adicionales al complejo anticuerpo/antígeno. Las etapas de amplificación se repiten hasta que se consigue un nivel adecuado de amplificación, en cuyo punto se incuba la muestra en una disolución que contiene el anticuerpo de segunda etapa frente a biotina. Se marca este anticuerpo de segunda etapa, como por ejemplo con una enzima que puede usarse para detectar la presencia del complejo anticuerpo/antígeno mediante histoenzimología usando un sustrato cromógeno. Con una amplificación adecuada, puede producirse un conjugado que es visible macroscópicamente.

Otro método conocido de inmunodetección aprovecha la metodología de la inmuno-PCR (reacción en cadena de la polimerasa). El método de PCR es similar al método de Cantor hasta la incubación con ADN biotinilado, sin embargo, en lugar de usar múltiples rondas de incubación con estreptavidina y ADN biotinilado, se lava el complejo

de ADN/biotina/estreptavidina/anticuerpo con un tampón de alto contenido en sal o bajo pH que libera el anticuerpo. La disolución de lavado resultante se usa entonces para llevar a cabo una reacción de PCR con cebadores adecuados con controles apropiados. Al menos en teoría, puede utilizarse la enorme especificidad y capacidad de amplificación de la PCR para detectar una sola molécula de antígeno.

i. ELISA

Tal como se detalló anteriormente, los inmunoensayos, en el sentido más simple y/o directo, son ensayos de unión. Ciertos inmunoensayos preferidos son los diversos tipos de ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) y/o radioinmunoanálisis (RIA) conocidos en la técnica. La detección inmunohistoquímica usando secciones de tejido también es particularmente útil. Sin embargo, se apreciará fácilmente que la detección no se limita a tales técnicas, y/o también puede usarse inmunotransferencia de tipo Western, transferencia de puntos, análisis de FACS y/o similares.

En un ELISA a modo de ejemplo, los anticuerpos se inmovilizan en una superficie seleccionada que presenta afinidad por proteínas, tal como un pocillo en una placa de microtitulación de poliestireno. Entonces, una composición de prueba que se sospecha que contiene el antígeno, tal como una muestra clínica, se añade a los pocillos. Tras la unión y/o el lavado para eliminar los inmunocomplejos unidos de manera no específica, puede detectarse el antígeno unido. La detección se consigue generalmente mediante la adición de otro anticuerpo que está unido a un marcador detectable. Este tipo de ELISA es un “ELISA en sándwich” simple. También puede conseguirse la detección mediante la adición de un segundo anticuerpo, seguido por la adición de un tercer anticuerpo que tiene afinidad de unión por el segundo anticuerpo, uniéndose el tercer anticuerpo a un marcador detectable. El ELISA puede basarse en la unión diferencial de un anticuerpo a una proteína con Arg389 frente a Gly389.

En otro ELISA a modo de ejemplo, las muestras que se sospecha que contienen el antígeno se inmovilizan sobre la superficie del pocillo y/o entonces se ponen en contacto con anticuerpos. Tras la unión y/o el lavado para eliminar inmunocomplejos unidos de manera no específica, se detectan los anti-anticuerpos unidos. Cuando los anticuerpos iniciales se unen a un marcador detectable, pueden detectarse directamente los inmunocomplejos. De nuevo, los inmunocomplejos pueden detectarse usando un segundo anticuerpo que tiene afinidad de unión por el primer anticuerpo, uniéndose el segundo anticuerpo a un marcador detectable.

Otro ELISA en el que los antígenos se inmovilizan, implica el uso de la competición de anticuerpos en la detección. En este ELISA, anticuerpos marcados frente a un antígeno se añaden a los pocillos, se permite que se unan y/o se detectan por medio de su marcador. Entonces, la cantidad de un antígeno en una muestra desconocida se determina mezclando la muestra con los anticuerpos marcados frente al antígeno durante la incubación con pocillos recubiertos. La presencia de un antígeno en la muestra actúa para reducir la cantidad de anticuerpo frente al antígeno disponible para su unión al pocillo y por tanto reduce la última señal. Esto también es apropiado para detectar anticuerpos frente a un antígeno en una muestra desconocida, en la que los anticuerpos no marcados se unen a los pocillos recubiertos con antígeno y también reduce la cantidad de antígeno disponible para unirse a los anticuerpos marcados.

Independientemente del formato empleado, los ELISA tienen ciertas características en común, tales como recubrimiento, incubación y unión, lavado para eliminar especies unidas de manera no específica y detección de los inmunocomplejos unidos. Éstos se describen a continuación.

Al recubrir una placa con o bien antígeno o bien anticuerpo, se incubarán generalmente los pocillos de la placa con una disolución del antígeno o anticuerpo, o bien durante la noche o bien durante un periodo especificado de horas. Entonces, los pocillos de la placa se lavarán para eliminar material adsorbido de manera incompleta. Cualquier superficie disponible restante de los pocillos se “recubre” entonces con una proteína no específica que es antigénicamente neutra con respecto a los antiseros de prueba. Éstos incluyen albúmina de suero bovino (BSA), caseína o disoluciones de leche en polvo. El recubrimiento permite el bloqueo de sitios de adsorción no específicos en la superficie de inmovilización y por tanto reduce los antecedentes provocados por la unión no específica de antiseros sobre la superficie.

En los ELISA, probablemente es más habitual usar un medio de detección secundario o terciario en lugar de un procedimiento directo. Por tanto, tras la unión de una proteína o anticuerpo al pocillo, recubrimiento con un material no reactivo para reducir el fondo, y lavado para eliminar el material no unido, se pone en contacto la superficie de inmovilización con la muestra biológica que va someterse a prueba en condiciones eficaces para permitir la formación de inmunocomplejos (antígeno/anticuerpo). Entonces, la detección del inmunocomplejo requiere un anticuerpo o ligando de unión secundario marcado, y un anticuerpo o ligando de unión secundario junto con un anticuerpo terciario marcado o un tercer ligando de unión.

“En condiciones eficaces para permitir la formación de inmunocomplejos (antígeno/anticuerpo)” significa que las condiciones incluyen preferiblemente diluir los antígenos y/o anticuerpos con disoluciones tales como BSA, gammaglobulina bovina (BGG) o solución salina tamponada con fosfato (PBS)/Tween. Estos agentes añadidos también tienden a ayudar en la reducción de fondo no específico.

Las condiciones “adecuadas” también significan que la incubación es a una temperatura o durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la unión eficaz. Las etapas de incubación normalmente son desde aproximadamente 1 hasta 2 hasta 4 horas o más, a temperaturas preferiblemente en el orden de 25°C a 27°C, o puede ser durante la noche a aproximadamente 4°C o más.

Tras todas las etapas de incubación en un ELISA, la superficie de contacto se lava de manera que se elimine el material no complejo. Un ejemplo de un procedimiento de lavado incluye lavar con una disolución tal como PBS/Tween, o tampón borato. Tras la formación de inmunocomplejos específicos entre la muestra de prueba y el material originalmente unido, y posterior lavado, puede determinarse la aparición de incluso cantidades diminutas de inmunocomplejos.

Para proporcionar un medio de detección, el segundo o tercer anticuerpo tendrá un marcador asociado para permitir la detección. Este puede ser una enzima que generará el desarrollo de color tras la incubación con un sustrato cromogénico apropiado. Por tanto, por ejemplo, se deseará poner en contacto o incubar el primer y segundo inmunocomplejo con un anticuerpo conjugado a ureasa, glucosa oxidasa, fosfatasa alcalina o hidrógeno peroxidasa durante un periodo de tiempo y en condiciones que favorezcan el desarrollo de formación de inmunocomplejos adicionales (por ejemplo, la incubación durante 2 horas a temperatura ambiente en una disolución que contiene PBS tal como PBS-Tween).

Tras incubación con el anticuerpo marcado, y posterior lavado para eliminar el material no unido, se cuantifica la cantidad del marcador, por ejemplo, mediante incubación con un sustrato cromogénico tal como urea, o púrpura de bromocresol, o ácido 2,2'-azino-di-(3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico (ABTS), o H_2O_2 , en el caso de peroxidasa como el marcador enzimático. Entonces se consigue la cuantificación midiendo el grado de color generado, por ejemplo, usando un espectrofotómetro de espectro visible.

ii. Inmunohistoquímica

Los anticuerpos de la presente invención también pueden usarse conjuntamente con bloques de tejido incrustados en parafina o bien recién congelados y/o bien fijados en formalina, preparados para su estudio mediante inmunohistoquímica (IHC). Por ejemplo, puede utilizarse la inmunohistoquímica para caracterizar la fortalina o evaluar la cantidad de fortalina en una célula. El método de preparación de bloques de tejido a partir de estas muestras particuladas se ha usado con éxito en estudios de IHC previos de diversos factores pronósticos, y/o se conoce bien por los expertos en la técnica (Brown *et al.*, 1990; Abbondanzo *et al.*, 1990; Allred *et al.*, 1990).

En resumen, pueden prepararse secciones congeladas rehidratando 50 mg de tejido congelado "pulverizado" a temperatura ambiente en solución salina tamponada con fosfato (PBS) en pequeñas cápsulas de plástico; sedimentando las partículas mediante centrifugación; resuspendiéndolas en un medio de incrustación viscoso (OCT); invirtiendo la cápsula y/o sedimentando de nuevo mediante centrifugación; congelando rápidamente en isopentano a -70°C ; cortando la cápsula de plástico y/o eliminando el cilindro de tejido congelado; fijando el cilindro de tejido en un mandril de sujeción de microtomo criostato; y/o cortando secciones de 25-50 en serie.

Pueden prepararse secciones permanentes mediante un método similar que implica la rehidratación de la muestra de 50 mg en un tubo de microfuga de plástico; sedimentar; resuspender en formalina al 10% para fijación de 4 horas; lavar/sedimentar; resuspender en agar al 2,5% caliente; sedimentar; enfriar en agua helada hasta endurecimiento del agar; retirar el bloque de tejido/agar del tubo; infiltrar y/o incrustar el bloque en parafina; y/o cortar hasta 50 secciones permanentes en serie.

III. Terapia

Una vez que se determina el genotipo o la secuencia de proteína de β_1 -AR del individuo, puede individualizarse un curso terapéutico de tratamiento. En una realización preferida del método, el rasgo de interés es una respuesta clínica mostrada por un paciente a algún tratamiento terapéutico, por ejemplo, respuesta a un fármaco tal como pero sin limitarse a un β -bloqueante, tal como bucindolol, que se dirige a β_1 AR o la respuesta a un tratamiento terapéutico para una afección. Tal como se usa en el presente documento, "afección" incluye pero no se limita a ningún estado o enfermedad manifestado como uno o más síntomas físicos y/o psicológicos para los que el tratamiento es deseable, e incluye enfermedades identificadas previa y recientemente y otros trastornos que tienen estados fisiopatológicos similares, tales como pero sin limitarse a, insuficiencia cardíaca, feocromocitoma, migrañas, arritmias cardíacas, hipertensión, cardiomiopatía dilatada, cardiopatía isquémica (cardiomiopatía, cardiopatía isquémica (cardiomiopatía, angina, infarto de miocardio) y diversos trastornos de ansiedad. Tal como se usa en el presente documento la expresión "respuesta clínica" significa cualquiera de o todos los siguientes: una medición cuantitativa de la eficacia o la potencia de la terapia y los acontecimientos adversos (es decir, efectos secundarios).

Por tanto, los individuos homocigotos para β_1 Arg389 que tienen una afección pueden ponerse en una terapia que incluya β -bloqueantes tales como pero sin limitarse a bucindolol. El β -bloqueante puede administrarse solo o en combinación con al menos otro agente distinto, tal como un compuesto estabilizante. El β -bloqueante también puede administrarse en combinación con un dispositivo médico que se había contraindicado previamente por el estado patológico que requería el dispositivo. Por ejemplo, normalmente un paciente con insuficiencia cardíaca con bradicardia no recibiría un β -bloqueante. Pero si el genotipo del individuo es Arg389 (el genotipo favorable) puede implementarse un marcapasos, para prescribir bucindolol.

A. Vías de administración

La administración del β -bloqueante puede ser mediante cualquier número de vías incluyendo, pero sin limitarse a oral, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intramedular, intratecal, intraventricular, intradérmica, intratraqueal,

intravesicular, intraocular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual o rectal. Detalles adicionales sobre técnicas para formulación y administración pueden encontrarse en la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, Pa.). En ciertas realizaciones, se formula buindolol para administración oral.

B. Formulaciones

Cuando se contemplan aplicaciones clínicas, se prepararán composiciones farmacéuticas en una forma apropiada para la aplicación prevista. Generalmente, esto implicará preparar composiciones que estén esencialmente libres de pirógenos, así como otras impurezas que puedan ser dañinas para los seres humanos o animales.

Se deseará en general emplear tampones y sales apropiadas para hacer que los vectores de suministro sean estables y permitan la captación por las células diana. También se emplearán tampones cuando se introduzcan células recombinantes en un paciente. Las composiciones acuosas de la presente invención comprenden una cantidad eficaz del vector o las células, disueltos o dispersados en un medio acuoso o vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refiere a composiciones y entidades moleculares que no producen reacciones adversas, alérgicas u otras desfavorables cuando se administran a un animal o a un ser humano. Tal como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye disolventes, tampones, disoluciones, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos y similares aceptables para su uso en la formulación de productos farmacéuticos, tales como productos farmacéuticos adecuados para la administración a seres humanos. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Excepto en tanto que cualquier agente o medio convencional sea incompatible con los principios activos de la presente invención, se contempla su uso en composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse principios activos complementarios en las composiciones, siempre que no inactiven los vectores o las células de las composiciones.

Las composiciones activas de la presente invención pueden incluir preparaciones farmacéuticas clásicas. La administración de estas composiciones según la presente invención puede ser por medio de cualquier vía común siempre y cuando el tejido diana esté disponible por medio de esa vía. Esto incluye la vía oral, nasal o bucal. Alternativamente, la administración puede ser mediante inyección intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa, o mediante inyección directa en el tejido cardíaco. Tales composiciones se administrarán normalmente como composiciones farmacéuticamente aceptables, tal como se describió anteriormente.

Los compuestos activos también pueden administrarse por vía parenteral o por vía intraperitoneal. A modo de ilustración; pueden prepararse disoluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables en agua mezcladas adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones comunes de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen generalmente un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen, por ejemplo, dispersiones o disoluciones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o disoluciones inyectables estériles. Generalmente, estas preparaciones son estériles y fluidas hasta el punto de que existe una fácil capacidad de inyección. Las preparaciones deben ser estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento y deben conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Los medios de dispersión o disolventes apropiados pueden contener, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede provocarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse mediante el uso en las composiciones de agentes retardantes de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Para administración oral, los polipéptidos de la presente invención generalmente pueden incorporarse con excipientes y usarse en forma de enjuagues bucales no ingeribles y dentífricos. Puede prepararse un enjuague bucal que incorpora el principio activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado, tal como una disolución de borato de sodio (disolución de Dobell). Alternativamente, puede incorporarse el principio activo en un lavado antiséptico que contiene borato de sodio, glicerina y bicarbonato de potasio. El principio activo también puede dispersarse en dentífricos, incluyendo: geles, pastas, polvos y suspensiones. El principio activo puede añadirse en una cantidad terapéuticamente eficaz a una pasta dentífrica que puede incluir agua, aglutinantes, abrasivos, agentes aromatizantes, agentes espumantes y humectantes.

Las composiciones de la presente invención generalmente pueden formularse de forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) derivadas de ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o de ácidos orgánicos (por ejemplo, acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres de la

proteína también pueden derivarse de bases inorgánicas (por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico) o de bases orgánicas (por ejemplo, isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares).

Tras la formulación, se administran preferiblemente las disoluciones de manera compatible con la formulación de la dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones pueden administrarse fácilmente en una variedad de formas farmacéuticas tales como disoluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármacos y similares. Para administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución generalmente se tampona adecuadamente y el diluyente líquido se hace primero isotónico por ejemplo con glucosa o solución salina suficiente. Tales disoluciones acuosas pueden usarse, por ejemplo, para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. Preferiblemente, se emplean medios acuosos estériles tal como conocen los expertos en la técnica, particularmente a la luz de la presente descripción. A modo de ilustración, una dosis única puede disolverse en 1 ml de disolución isotónica de NaCl y o bien añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermoclisis o bien inyectarse en el sitio propuesto de infusión, (véase por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Cierta variación en la dosificación se producirá necesariamente dependiendo del estado del sujeto que se trate. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual. Además, para la administración humana, las preparaciones deben cumplir las normas de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza tal como lo requiere la Oficina de Normas Biológicas de la FDA.

1. Administración de liberación controlada/extendida/sostenida/prolongada

Otro aspecto de esta invención proporciona métodos de tratamiento de pacientes con insuficiencia cardíaca administrando el β -bloqueante a un paciente, que tiene un genotipo homocigoto para β_1 Arg389, como una formulación de liberación controlada. Tal como se usa en el presente documento, los términos liberación "controlada", "extendida", "sostenida" o "prolongada" de la composición de la presente invención se denominarán colectivamente "liberación controlada" en el presente documento e incluye la liberación continua o discontinua, y lineal o no-lineal de la composición de la presente invención. Existen muchas ventajas para una formulación de liberación controlada de β -bloqueantes.

a. Comprimidos

Un comprimido de liberación controlada adecuado para los fines de esta invención se da a conocer en la patente estadounidense n.º 5.126.145. Este comprimido comprende, en mezcla, aproximadamente un 5-30% de hidroxipropilmetilcelulosa de alta viscosidad, aproximadamente un 2-15% de un aglutinante farmacéutico soluble en agua, aproximadamente un 2-20% de un componente hidrófobo tal como un material ceroso, por ejemplo, un ácido graso, y aproximadamente un 30-90% del principio activo.

b. Películas

Esta invención proporciona además una profilaxis para un método de tratamiento de un paciente que tiene un genotipo homocigoto para β_1 Arg389 tras un procedimiento cardíaco invasivo que comprende administrar una película polimérica biodegradable, biocompatible que comprende un β -bloqueante, tal como bucindolol, a un paciente. Las películas poliméricas son delgadas en comparación con su longitud y anchura. Las películas normalmente tienen un espesor seleccionado uniforme de entre aproximadamente 60 micrómetros y aproximadamente 5 mm. Las películas de entre aproximadamente 600 micrómetros y 1 mm y de entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 5 mm de espesor, así como películas de entre aproximadamente 60 micrómetros y aproximadamente 1000 micrómetros, y de entre aproximadamente 60 y aproximadamente 300 micrómetros son útiles en la fabricación de implantes terapéuticos para su inserción en el cuerpo de un paciente. Las películas pueden administrarse al paciente de manera similar a los métodos usados en cirugías de adhesión. Por ejemplo, una formulación de película de un β -bloqueante, tal como bucindolol, puede pulverizarse o rociarse sobre un sitio de tejido cardíaco o arteria durante intervención quirúrgica, o una película formada puede colocarse sobre el sitio de tejido seleccionado. En una realización alternativa, la película puede usarse como recubrimiento de liberación controlada en un dispositivo médico tal como una endoprótesis, tal como se discute con mayor detalle a continuación.

Pueden usarse polímeros o bien biodegradables o bien no biodegradables para fabricar implantes en los que el β -bloqueante se distribuye uniformemente por toda la matriz de polímero. En la técnica se conoce una serie de polímeros biodegradables adecuados para su uso en la preparación de las películas biodegradables de esta invención, incluyendo polianhídridos y poliésteres alifáticos, preferiblemente poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA) y mezclas y copolímeros de los mismos, más preferiblemente copolímeros 50:50 de PLA:PGA y lo más preferiblemente copolímeros 75:25 de PLA:PGA. También pueden usarse enantiómeros individuales de PLA, preferiblemente L-PLA, o bien solo o bien en combinación con PGA. También pueden usarse policarbonatos, polifumaratos y caprolactonas para preparar los implantes de esta invención.

La cantidad del β -bloqueante, tal como bucindolol, que va a incorporarse en las películas poliméricas de esta invención es una cantidad eficaz para mostrar un efecto medible en el tratamiento de enfermedades que tienen estados fisiopatológicos similares, tales como pero sin limitarse a, insuficiencia cardíaca, feocromocitoma, migrañas, arritmias cardíacas, hipertensión, isquemia, cardiomiopatía y diversos trastornos de ansiedad. La composición de la presente invención puede incorporarse en la película mediante diversas técnicas tales como mediante métodos de disolución, métodos de suspensión o prensado en fundido.

c. Dispositivo de parche transdérmico

La administración transdérmica implica la administración de un agente terapéutico a través de la piel para su distribución en el interior del cuerpo mediante la circulación de la sangre. La administración transdérmica puede compararse con administración intravenosa controlada, continua, de un fármaco usando la piel como puerta de entrada en lugar de una aguja intravenosa. El agente terapéutico pasa a través de las capas externas de la piel, se difunde hacia los capilares o vasos sanguíneos diminutos en la piel y después se transporta hacia el sistema circulatorio principal.

Los dispositivos de parche transdérmico que proporcionan una administración continua, controlada, de un agente terapéutico a través la piel se conocen bien en la técnica. Tales dispositivos, por ejemplo, se dan a conocer en las patentes estadounidense n.º 4.627.429; 4.784.857; 5.662.925; 5.788.983; y 6.113.940. Característicamente, estos dispositivos contienen una capa posterior impermeable al fármaco que define la superficie externa del dispositivo y una membrana de unión a la piel permeable, tal como una capa adhesiva, sellada a la capa de barrera de manera que se crea un depósito entre ellos en el que se coloca el agente terapéutico. En una realización de la presente invención se introduce una formulación del β -bloqueante en el depósito de un parche transdérmico y se usa por un paciente que es homocigoto para Arg389 en los genes β_1 AR.

d. Dispositivos médicos

Otra realización contempla la incorporación de un β -bloqueante, tal como bucindolol, en un dispositivo médico que después se coloca en una ubicación objetivo deseada en el interior del cuerpo, tras lo cual el β -bloqueante se eluye desde el dispositivo médico. Tal como se usa en el presente documento, “dispositivo médico” se refiere a un dispositivo que se introduce temporal o permanentemente en un mamífero para la profilaxis o terapia de una afección. Estos dispositivos incluyen cualquiera que se introduzca por vía subcutánea, por vía percutánea o quirúrgicamente para reposar en el interior de un órgano, tejido o luz. Los dispositivos médicos incluyen, pero no se limitan a, endoprótesis, injertos sintéticos, válvulas cardíacas artificiales, corazones artificiales y accesorios para conectar el órgano protésico a la circulación vascular, válvulas venosas, injertos de aneurisma de aorta abdominal (AAA), filtros para la vena cava inferior, catéteres incluyendo catéteres para infusión de fármaco permanente, bobinas embólicas, materiales embólicos usados en embolización vascular (por ejemplo, espumas de PVA), materiales de reparación de malla, una partícula vascular Dracon, tornillos, barras y placas metálicas ortopédicas y suturas vasculares.

En una realización, el dispositivo médico tal como una endoprótesis o un injerto se recubre con una matriz. La matriz usada para recubrir la endoprótesis o el injerto según esta invención puede prepararse a partir de una variedad de materiales. Un requisito primario para la matriz es que sea suficientemente elástica y flexible para que permanezca sin romperse en las superficies expuestas de la endoprótesis o el injerto sintético.

C. Dosificaciones

La cantidad de bucindolol que se administra o prescribe al paciente puede ser de aproximadamente, al menos aproximadamente o como máximo aproximadamente 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500 mg o cualquier intervalo derivable en los mismos. Alternativamente, la cantidad administrada o prescrita puede ser de aproximadamente, al menos aproximadamente o como máximo aproximadamente 0,001, 0,002, 0,003, 0,004, 0,005, 0,006, 0,007, 0,008, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0 mg/kg o cualquier intervalo derivable en los mismos, con respecto al peso del paciente.

Cuando se proporciona en una cantidad discreta, cada ingesta de bucindolol puede considerarse una “dosis”. Un profesional médico puede prescribir o administrar múltiples dosis de bucindolol durante un transcurso de tiempo particular (régimen de tratamiento) o indefinidamente. Se contempla que bucindolol

Bucindolol puede administrarse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o más veces o cualquier intervalo derivable en los mismos. Se contempla además que el fármaco puede tomarse durante un periodo indefinido de tiempo o mientras que el paciente presente síntomas de la afección para la que se prescribió o administró bucindolol. Además, el fármaco puede administrarse cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 horas, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días, o 1, 2, 3, 4, 5 semanas, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses o más, o cualquier intervalo derivable en los mismos. Alternativamente, puede administrarse sistémicamente durante cualquier periodo de tiempo de este tipo y extenderse más allá de más de un año.

65 D. Otras opciones terapéuticas

En ciertas realizaciones de la invención, los métodos pueden implicar administrar un betabloqueante que no sea bucindolol o que sea un ionótrolo, un diurético, ACE-I, antagonista AII, BNP, bloqueante de Ca^{++} o un inhibidor

de HDAC. Estos agentes pueden prescribirse o administrarse en lugar de o además de bucindolol después de que se evalúen los polimorfismos de β_1 AR y/o α_{2c} -AR.

Como segundo régimen terapéutico, el agente puede administrarse o tomarse al mismo tiempo que bucindolol, u o bien antes o bien después de bucindolol. El tratamiento puede mejorar uno o más síntomas de la insuficiencia cardíaca o hipertrofia cardíaca patológica tal como proporcionando capacidad de ejercicio aumentada, volumen de eyección cardíaco aumentado, presión diastólica y ventricular izquierda disminuida, presión de enclavamiento capilar pulmonar disminuida, índice cardíaco o gasto cardíaco aumentado, presiones de arterias pulmonares disminuidas, dimensiones diastólicas y sistólicas del extremo ventricular izquierdo disminuidas, tensión de la pared ventricular derecha e izquierda disminuida, espesor de la pared y tensión de la pared disminuidos, calidad de vida aumentada, y morbilidad relacionada con la enfermedad disminuida.

En otra realización, se prevé usar bucindolol en combinación con otras modalidades terapéuticas. Por tanto, además de las terapias descritas anteriormente, también se pueden proporcionar al paciente terapias cardíacas farmacéuticas más “convencionales”. Ejemplos de otras terapias incluyen, sin limitación, otros betabloqueantes, anti-hipertensores, cardiotónicos, antitrombóticos, vasodilatadores, antagonistas de hormonas, ionótrofos, diuréticos, antagonistas de endotelina, bloqueantes de los canales de calcio, inhibidores de la fosfodiesterasa, inhibidores de la ACE, antagonistas de la angiotensina tipo 2 y bloqueantes/inhibidores de citocinas, e inhibidores de HDAC.

Pueden conseguirse combinaciones poniendo en contacto células cardíacas con una sola composición o formulación farmacéutica que incluye ambos agentes, o poniendo en contacto la célula con dos composiciones o formulaciones distintas, al mismo tiempo, incluyendo una composición el constructo de expresión y la otra el agente. Alternativamente, la terapia que usa bucindolol puede preceder o seguir a la administración del/de los otro(s) agente(s) en intervalos que oscilan desde minutos hasta semanas. En realizaciones en las que el otro agente y el constructo de expresión se aplican por separado a la célula, se garantizará generalmente que un periodo significativo de tiempo no vencerá entre el tiempo de cada administración, de manera que el agente y el constructo de expresión todavía podrán ejercer un efecto combinado ventajosamente sobre la célula. En tales casos, se contempla que se pondrá en contacto normalmente la células con ambas modalidades en un plazo de aproximadamente 12-24 horas entre sí y, más preferiblemente, en un plazo de aproximadamente 6-12 horas entre sí, prefiriéndose más un tiempo de retraso de sólo aproximadamente 12 horas. En algunas situaciones, puede ser deseable extender el periodo de tiempo para el tratamiento de manera significativa, sin embargo, cuando transcurran de varios días (2, 3, 4, 5, 6 ó 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) entre las administraciones respectivas.

También es concebible que se desee más de una administración de o bien bucindolol o bien el otro agente. Con respecto a esto, pueden emplearse diversas combinaciones. A modo de ilustración, cuando el bucindolol es “A” y el otro agente es “B”, las siguientes permutaciones basándose en 3 y 4 administraciones totales se muestran a modo de ejemplo:

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B

A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B B/B/B/A

A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B

Igualmente se contemplan otras combinaciones.

1. Agentes terapéuticos farmacológicos

Los expertos en la técnica conocen bien los agentes terapéuticos farmacológicos y métodos de administración, dosificaciones, etc., (véase por ejemplo, la “Physicians Desk Reference”, “The Pharmacological Basis of Therapeutics” de Klaassen, “Remington’s Pharmaceutical Sciences” y “The Merck Index”, onceava edición), y pueden combinarse con la invención a la luz de las descripciones en el presente documento. Cierta variación en la dosificación se producirá necesariamente dependiendo del estado del sujeto que se trate. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual, y tales determinaciones individuales están dentro de la habilidad de los expertos en la técnica.

Ejemplos no limitativos de un agente terapéutico farmacológico que puede usarse en la presente invención incluyen un agente antihiperlipoproteínémico, un agente antiarteriosclerótico, un agente antitrombótico/fibrinolítico, un coagulante sanguíneo, un agente antiarrítmico, un agente antihipertensor, un vasopresor, un agente de tratamiento para la insuficiencia cardíaca congestiva, un agente antianginoso, un agente antibacteriano o una combinación de los mismos.

Además, debe observarse que cualquiera de los siguientes puede usarse para desarrollar nuevos conjuntos de genes diana para terapia cardíaca tal como se usaron los β -bloqueantes en los presentes ejemplos (véase a continuación). Aunque se espera que muchos de estos genes puedan solaparse, probablemente pueden desarrollarse nuevas dianas génicas.

a. *Antihiperlipoproteínemicos*

En ciertas realizaciones, la administración de un agente que reduce la concentración de uno o más lípidos y/o lipoproteínas en sangre, conocido en el presente documento como “antihiperlipoproteínémico”, puede combinarse con una terapia cardiovascular según la presente invención, particularmente en el tratamiento de la aterosclerosis y los engrosamientos o bloqueos de tejidos vasculares. En ciertos aspectos, un agente antihiperlipoproteínémico puede comprender un derivado del ácido ariloxialcanoico/fíbrico, una resina/secuestrante de ácidos biliares, un inhibidor de la HMG CoA reductasa, un derivado del ácido nicotínico, una hormona tiroidea o un análogo de hormona tiroidea, un agente misceláneo o una combinación de los mismos.

i. *Derivados del ácido ariloxialcanoico/ácido fíbrico*

Los ejemplos no limitativos de los derivados del ácido ariloxialcanoico/fíbrico incluyen beclobrato, enzafibrato, binifibrato, ciprofibrato, clonofibrato, clofibrato (atromida-S), ácido cofíbrico, etofibrato, fenofibrato, gemfibrozilo (Iobid), nicofibrato, pirifibrato, ronifibrato, simfibrato y teofibrato.

ii. *Resinas/secuestrantes de ácidos biliares*

Los ejemplos no limitativos de las resinas/secuestrantes de ácidos biliares incluyen colestiramina (cholybar, ques-tran), colestipol (colestid) y polidexida.

iii. *Inhibidores de la HMG CoA reductasa*

Los ejemplos no limitativos de los inhibidores de la HMG CoA reductasa incluyen lovastatina (mevacor), pravastatina (pravochol) o simvastatina (zocor).

iv. *Derivados del ácido nicotínico*

Los ejemplos no limitativos de los derivados del ácido nicotínico incluyen nicotinato, acepimox, niceritrol, niconato, nicomol y ácido oxiniácico.

v. *Hormonas tiroideas y análogos*

Los ejemplos no limitativos de las hormonas tiroideas y análogos de las mismas incluyen etoroxato, ácido tiropró-pico y tiroxina.

vi. *Antihiperlipoproteínemicos misceláneos*

Los ejemplos no limitativos de los antihiperlipoproteínemicos misceláneos incluyen acifrano, azacosterol, ben-fluorex, β -benzalbutiramida, carnitina, sulfato de condroitina, clomestrona, detaxtrano, dextranosulfato de sodio, ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico, eritadenina, furazabol, meglutol, melinamida, mitatrienodiol, ornitina, γ -orizanol, pantetina, tetraacetato de pentaeritritol, α -fenilbutiramida, pirozadilo, probucol (lorelco), β -sitosterol, ácido sultosílico, sal de piperazina, tiadenol, triparanol y xembucina.

b. *Antiarterioscleróticos*

Los ejemplos no limitativos de un antiarteriosclerótico incluyen carbamato de piridinol.

c. *Agentes antitrombóticos/fibrinolíticos*

En ciertas realizaciones, la administración de un agente que ayuda en la eliminación o la prevención de coágulos sanguíneos puede combinarse con la administración de un modulador, particularmente en el tratamiento de la aterosclerosis y bloqueos de la vasculatura (por ejemplo, arterial). Los ejemplos no limitativos de los agentes antitrombóticos y/o fibrinolíticos incluyen anticoagulantes, antagonistas de anticoagulantes, agentes antiplaquetarios, agentes trombolíticos, antagonistas de agentes trombolíticos o combinaciones de los mismos.

En ciertos aspectos, se prefieren agentes antitrombóticos que puede administrarse por vía oral, tales como, por ejemplo, aspirina y warfarina (cumadina).

i. *Anticoagulantes*

Un ejemplo no limitativo de un anticoagulante incluye acenocumarol, ancrod, anisindiona, bromindiona, clorindiona, cumetarol, ciclocumarol, dextranosulfato de sodio, dicumarol, difenadiona, biscumacetato de etilo, etiliden dicumarol, fluindiona, heparina, hirudina, liapolato de sodio, oxazidiona, polisulfato de pentosano, fenindiona, fenprocumón, fosvitina, picotamida, tiocumarol y warfarina.

ii. *Agentes antiplaquetarios*

Los ejemplos no limitativos de los agentes antiplaquetarios incluyen aspirina, un dextrano, dipiridamol (persantin), heparina, sulfinpiranona (anturane) y ticlopidina (ticlid).

iii. *Agentes trombolíticos*

Los ejemplos no limitativos de los agentes trombolíticos incluyen activador tisular del plasminógeno (activase), plasmina, prourocinasa, urocinasa (abbocinasa), estreptocinasa (streptase), anistreplasa/APSAC (eminase).

d. *Coagulantes sanguíneos*

En ciertas realizaciones en las que un paciente padece una hemorragia o una probabilidad aumentada de hemorragia, puede usarse un agente que pueda potenciar la coagulación sanguínea. Los ejemplos no limitativos de un agente promotor de la coagulación sanguínea incluyen antagonistas de agentes trombolíticos y antagonistas de anticoagulantes.

i. *Antagonistas de anticoagulantes*

Los ejemplos no limitativos de los antagonistas de anticoagulantes incluyen protamina y vitamina K1.

ii. *Antagonistas de agentes trombolíticos y antitrombóticos*

Los ejemplos no limitativos de los antagonistas de agentes trombolíticos incluyen ácido amiocaproico (amicar) y ácido tranexámico (amstat). Los ejemplos no limitativos de los antitrombóticos incluyen anagrelida, argatroban, cilostazol, daltroban, defibrotida, enoxaparina, fraxiparina, indobufeno, lamoparano, ozagrel, picotamida, plafibrida, tedelparina, ticlopidina y triflusal.

e. *Agentes antiarrítmicos*

Los ejemplos no limitativos de los agentes antiarrítmicos incluyen agentes antiarrítmicos de clase I (bloqueantes de los canales de sodio), agentes antiarrítmicos de clase II (bloqueantes beta-adrenérgicos), agentes antiarrítmicos de clase II (fármacos que prolongan la repolarización), agentes antiarrítmicos de clase IV (bloqueantes de los canales de calcio) y agentes antiarrítmicos misceláneos.

i. *Bloqueantes de los canales de sodio*

Los ejemplos no limitativos de los bloqueantes de los canales de sodio incluyen agentes antiarrítmicos de clase IA, clase IB y clase IC. Los ejemplos no limitativos de los agentes antiarrítmicos de clase IA incluyen dispiramida (norpace), procainamida (pronestyl) y quinidina (quinidex). Los ejemplos no limitativos de los agentes antiarrítmicos de clase IB incluyen lidocaína (xylocaine), tocainida (tonocard) y mexiletina (mexitil). Los ejemplos no limitativos de los agentes antiarrítmicos de clase IC incluyen encainida (enkaid) y flecainida (tambocor).

ii. *Betabloqueantes*

Los ejemplos no limitativos de un betabloqueante, de otra manera conocido como un bloqueante β -adrenérgico, un antagonista β -adrenérgico o un agente antiarrítmico de clase II, incluyen acebutolol (sectral), alprenolol, amosulalol, arotinolol, atenolol, befunolol, betaxolol, bevantolol, bisoprolol, bopindolol, bucumolol, bufetolol, bufuralol, bunitrolol, bupranolol, clorhidrato de butidrina, butofilolol; carazolol, carteolol, carvedilol, celiprolol, cetamolol, cloranolol, dilevalol, epanolol, esmolol (brevibloc), indenolol, labetalol, levobunolol, mepindolol, metipranolol, metoprolol, moprolool, nadolol, nadoxolol, nifenalol, nipradilol, oxprenolol, pambutolol, pindolol, practolol, pronetalol, propranolol (inalderal), sotalol (betapace), sulfinalol, talinolol, tertatolol, timolol, toliprolol y xibinolol. En ciertos aspectos, el betabloqueante comprende un derivado de ariloxipropanolamina. Los ejemplos no limitativos de los derivados de ariloxipropanolamina incluyen acebutolol, alprenolol, arotinolol, atenolol, betaxolol, bevantolol, bisoprolol, bopindolol, bunitrolol, butofilolol, carazolol, carteolol, carvedilol, celiprolol, cetamolol, epanolol, indenolol, mepindolol, metipranolol, metoprolol, moprolool, nadolol, nipradilol, oxprenolol, pambutolol, pindolol, propranolol, talinolol, tertatolol, timolol y toliprolol.

iii. *Agentes que prolongan la repolarización*

Los ejemplos no limitativos de un agente que prolonga la repolarización, también conocido como un agente antiarrítmico de clase III, incluyen amiodarona (cordarone) y sotalol (betapace).

iv. *Bloqueantes/Antagonistas de los canales de calcio*

Los ejemplos no limitativos de un bloqueante de los canales de calcio, de otra manera conocido como un agente antiarrítmico de clase IV, incluyen una arilalquilamina (por ejemplo, bepridil, diltiazem, fendilina, galopamilo, prenilamina, terodilina, verapamilo), un derivado de dihidropiridina (felodipino, isradipino, nicardipino, nifedipino, ni-

modipino, nisoldipino, nitrendipino) un derivado de piperazina (por ejemplo, cinarizina, flunarizina, lidoflazina) o un bloqueante de los canales de calcio misceláneo tal como benciclano, etafenona, magnesio, mibefradilo o perhexilina. En ciertas realizaciones un bloqueante de los canales de calcio comprende un antagonista de calcio de dihidropiridina (del tipo de nifedipino) de acción prolongada.

v. Agentes antiarrítmicos misceláneos

Los ejemplos no limitativos de los agentes antiarrítmicos misceláneos incluyen adenosina (adenocard), digoxina (lanoxin), acecainida, ajmalina, amoproxano, aprindina, tosilato de bretilio, bunaftina, butobendina, ácido capobénico, cifenlina, disopiranida, hidroquinidina, indecainida, bromuro de ipatropio, lidocaína, lorajmina, lorcainida, meobentina, moricizina, pirmenol, prajmalina, propafenona, pirinolina, poligalacturonato de quinidina, sulfato de quinidina y viquidil.

f. Agentes antihipertensores

Los ejemplos no limitativos de los agentes antihipertensores incluyen simpaticolíticos, alfa/beta-bloqueantes, alfa-bloqueantes, agentes antiangiotensina II, betabloqueantes, bloqueantes de los canales de calcio, vasodilatadores y antihipertensores misceláneos.

i. Alfa-bloqueantes

Los ejemplos no limitativos de un alfa-bloqueante, también conocido como un bloqueante α -adrenérgico o un antagonista α -adrenérgico, incluyen amosulalol, arotinolol, dapiprazol, doxazosina, mesilatos ergoloides, fenspirida, indoramina, labetalol, nicergolina, prazosina, terazosina, tolazolina, trimazosina y yohimbina. En ciertas realizaciones, un alfa-bloqueante puede comprender un derivado de quinazolina. Los ejemplos no limitativos de los derivados de quinazolina incluyen alfuzosina, bunazosina, doxazosina, prazosina, terazosina y trimazosina.

ii. Alfa/beta-bloqueantes

En ciertas realizaciones, un agente antihipertensor es un antagonista adrenérgico tanto alfa como beta. Los ejemplos no limitativos de un alfa/beta-bloqueante comprenden labetalol (normodyne, trandate).

iii. Agentes antiangiotensina II

Los ejemplos no limitativos de los agentes antiangiotensina II incluyen inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y antagonistas de los receptores de angiotensina II. Los ejemplos no limitativos de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (inhibidores de la ACE) incluyen alacepril, enalapril (vasotec), captopril, cilazapril, delapril, enalaprilato, fosinopril, lisinopril, moveltopril, perindopril, quinapril y ramipril. Los ejemplos no limitativos de un bloqueante de los receptores de angiotensina II, también conocido como un antagonista de los receptores de angiotensina II, un bloqueante de los receptores ANG o un bloqueante de los receptores ANG-II tipo-I (ARB), incluyen angiocandesartán, eprosartán, irbesartán, losartán y valsartán.

iv. Simpaticolíticos

Los ejemplos no limitativos de un simpaticolítico incluyen un simpaticolítico de acción central o un simpaticolítico de acción periférica. Los ejemplos no limitativos de un simpaticolítico de acción central, también conocido como un simpaticolítico del sistema nervioso central (SNC), incluyen clonidina (catapres), guanabenz (wyntensin) guanfacina (tenex) y metildopa (aldomet). Los ejemplos no limitativos de un simpaticolítico de acción periférica incluyen un agente de bloqueo ganglionar, un agente de bloqueo neuronal adrenérgico, un agente de bloqueo β -adrenérgico o un agente de bloqueo alfa1-adrenérgico. Los ejemplos no limitativos de un agente de bloqueo ganglionar incluyen mecamilamina (inversine) y trimetafano (arfonad). Los ejemplos no limitativos de un agente de bloqueo neuronal adrenérgico incluyen acenitolol (sectral), atenolol (tenormin), betaxolol (kerlone), carteolol (cartrol), labetalol (normodyne, trandate), metoprolol (lopressor), nadanol (corgard), pebutolol (levatol), pindolol (visken), propranolol (inderal) y timolol (blocadren). Los ejemplos no limitativos de un bloqueante alfa1-adrenérgico incluyen prazosina (minipress), doxazocina (cardura) y terazosina (hytrin).

v. Vasodilatadores

En ciertas realizaciones un agente terapéutico cardiovascular puede comprender un vasodilatador (por ejemplo, un vasodilatador cerebral, un vasodilatador coronario o un vasodilatador periférico). En ciertas realizaciones preferidas, un vasodilatador comprende un vasodilatador coronario. Los ejemplos no limitativos de un vasodilatador coronario incluyen amotrifeno, bendazol, hemisucinato de benfurodilo, benziodarona, cloracizina, cromonar, clobenfurol, clonitrato, dilazep, dipiridamol, droprenilamina, efloxato, tetranitrato de eritritilo, etafenona, fendilina, floredil, ganglefeno, herestrol bis(β -dietilaminoetil éter), hexobendina, tosilato de itramina, quelina, lidoflanina, hexanitrato de manitol, medibazina, nitroglicerina, tetranitrato de pentaeritritol, pentritinol, perhexilina, pimefilina, trapidilo, tricromilo, trimetazidina, fosfato de trolnitrato y visnadina.

En ciertos aspectos, un vasodilatador puede comprender un vasodilatador para terapia crónica o un vasodilatador para emergencia hipertensiva. Los ejemplos no limitativos de un vasodilatador para terapia crónica incluyen hidralazina (apresoline) y minoxidilo (loniten). Los ejemplos no limitativos de un vasodilatador para emergencia hipertensiva incluyen nitroprusiato (nipride), diazóxido (hyperstat IV), hidralazina (apresoline), minoxidilo (loniten) y verapamilo.

vi. Antihipertensores misceláneos

Los ejemplos no limitativos de los antihipertensores misceláneos incluyen ajmalina, ácido γ -aminobutírico, bufenidol, cicletaina, cicloisidomina, un tanato de criptenamina, fenoldopán, flosequinan, ketanserina, mebutamato, mecamilamina, metildopa, metil 4-piridil cetona tiosemicarbazona, muzolimina, pargilina, pempidina, pinacidilo, piperoxano, primaperona, una protoveratrina, raubasina, rescimetol, rilmenideno, saralasina, nitroprusiato de sodio, ticrinafeno, cansilato de trimetafano, tirosinasa y urapidil.

En ciertos aspectos, un antihipertensor puede comprender un derivado de ariletanolamina, un derivado de benzotiadiazina, un derivado de N-carboxialquil-(péptido/lactama), un derivado de dihidropiridina, un derivado de guanidina, una hidrazina/ftalazina, un derivado de imidazol, un compuesto de amonio cuaternario, un derivado de reserpina o un derivado de sulfonamida.

Derivados de ariletanolamina. Los ejemplos no limitativos de los derivados de ariletanolamina incluyen amosulolol, bufuralolol, dilevalol, labetalol, pronetalol, sotalol y sulfinalol.

Derivados de benzotiadiazina. Los ejemplos no limitativos de derivados de benzotiadiazina incluyen altizida, benidroflumetiazida, benzotiazida, bencilhidroclorotiazida, butiazida, clorotiazida, clortalidona, ciclopentiazida, ciclotiazida, diazóxido, epitiazida, etiazida, fenquizona, hidroclorotiazida, hidroflumetiazida, metilclotiazida, meticrano, metolazona, paraflutizida, politiazida, tetraclormetiazida y triclormetiazida.

Derivados de N-carboxialquil-(péptido/lactama). Los ejemplos no limitativos de los derivados de N-carboxialquil-(péptido/lactama) incluyen alacepril, captopril, cilazapril, delapril, enalapril, enalaprilato, fosinopril, lisinopril, moveltipril, perindopril, quinapril y ramipril.

Derivados de dihidropiridina. Los ejemplos no limitativos de los derivados de dihidropiridina incluyen amlodipino, felodipino, isradipino, nicardipino, nifedipino, nilvadipino, nisoldipino y nitrendipino.

Derivados de guanidina. Los ejemplos no limitativos de los derivados de guanidina incluyen betanidina, debrisoquina, guanabenz, guanaclina, guanadrel, guanazodina, guanetidina, guanfacina, guanoclor, guanoxabenz y guanoxano.

Hidrazinas/ftalazinas. Los ejemplos no limitativos de las hidrazinas/ftalazinas incluyen budralazina, cadralazina, dihidralazina, endralazina, hidracarbazina, hidralazina, feniprazina, pildralazina y todralazina.

Derivados de imidazol. Los ejemplos no limitativos de los derivados de imidazol incluyen clonidina, lofexidina, fentolamina, tiamenidina y tolonidina.

Compuestos de amonio cuaternario. Los ejemplos no limitativos de los compuestos de amonio cuaternario incluyen bromuro de azametonio, cloruro de clorisondamina, hexametonio, bis(metilsulfato) de pentacinio, bromuro de pentametonio, tartrato de pentolinio, cloruro de fenactopinio y metosulfato de trimethidinio.

Derivados de reserpina. Los ejemplos no limitativos de derivados de reserpina incluyen bietaserpina, deserpidina, rescinamina, reserpina y sirotingopina.

Derivados de sulfonamida. Los ejemplos no limitativos de derivados de sulfonamida incluyenambutida, clopamida, furosemida, indapamida, quinetazonotripana y xipamida.

vii. Vasopresores

Los vasopresores generalmente se usan para aumentar la tensión arterial durante un choque, que puede producirse durante un procedimiento quirúrgico. Los ejemplos no limitativos de un vasopresor, también conocido como un antihipotensor, incluyen metilsulfato de amecinio, angiotensina amida, dimetofrina, dopamina, etifelmina, etilefrina, gepefrina, metaraminol, midodrina, norepinefrina, folefrina y sinefrina.

g. Agentes de tratamiento para la insuficiencia cardíaca congestiva

Los ejemplos no limitativos de los agentes para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva incluyen agentes antiangiotensina II, tratamiento de reducción postcarga-precarga, diuréticos y agentes inotrópicos.

i. Reducción postcarga-precarga

En ciertas realizaciones, un paciente animal que no puede tolerar un antagonista de la angiotensina puede tratarse con una terapia de combinación. Tal terapia puede combinar la administración de hidralazina (apresoline) y dinitrato de isosorbida (isordil, sorbitrate).

ii. Diuréticos

Los ejemplos no limitativos de un diurético incluyen un derivado de tiazida o benzotiadiazina (por ejemplo, al-tiazida, bendroflumetazida, benzotiazida, bencilhidroclorotiazida, butiazida, clorotiazida, clorotiazida, clortalidona, ciclo-pentiazida, epitiazida, etiazida, etiazida, fenquizona, hidroclorotiazida, hidroflumetiazida, metilclotiazida, meti-crano, metolazona, paraflutizida, politiazida, tetraclorometiazida, triclormetiazida), un organomercúrico (por ejemplo, clormerodrina, meralurida, mercanfamida, mercaptomerina de sodio, ácido mercumalílico, mercumatilina de sodio, cloruro mercurioso, mersalilo), una pteridina (por ejemplo, furtereno, triamtereno), purinas (por ejemplo, acefilina, 7-morfolinometilteofilina, pamabron, proteobromina, teobromina), esteroides incluyendo antagonistas de la aldostero-na (por ejemplo, canrenona, oleandrina, espironolactona), un derivado de sulfonamida (por ejemplo, acetazolamida, ambusida, azosemida, bumetanida, butazolamida, cloraminofenamida, clofenamida, clopamida, clorexolona, difenil-metano-4,4'-disulfonamida, disulfamida, etoxzolamida, furosemida, indapamida, mefrusida, metazolamida, piretani-da, quinetazona, torasemida, tripamida, xipamida), un uracilo (por ejemplo, aminometradina, amisometradina), un antagonista de ahorrador de potasio (por ejemplo, amilorida, triamtereno) o un diurético misceláneo tal como amino-zina, arbutina, clorazano, ácido etacrínico, etozolina, hidracarbazina, isosorbida, manitol, metocalcona, muzolimina, perhexilina, ticrinafeno y urea.

iii. Agentes inotrópicos

Los ejemplos no limitativos de un agente inotrópico positivo, también conocido como un cardiotónico, incluyen acefilina, una acetildigoxina, 2-amino-4-picolina, amrinona, hemisuccinato de benfurodilo, bucladesina, cerberosina, canfotamida, convalatoxina, cimarina, denopamina, deslanósido, digitalina, digitalis, digitoxina, digoxina, dobutami-na, dopamina, dopexamina, enoximona, eritrofleína, fenalcomina, gitalina, gitoxina, glicociamina, heptaminol, hi-drastinina, ibopamina, un lanatósido, metamiván, milrinona, nerifolina, oleandrina, ouabaina, oxifedrina, prenalterol, proscilaridina, resibufogenina, escilareno, escilarenina, estrofantina, sulmazol, teobromina y xamoterol.

En aspectos particulares, un agente inotrópico es un glicósido cardíaco, una agonista beta-adrenérgico o un in-hibidor de la fosfodiesterasa. Los ejemplos no limitativos de un glicósido cardíaco incluyen digoxina (lanoxin) y digitoxina (crystodigin). Los ejemplos no limitativos de un agonista β -adrenérgico incluyen albuterol, bambuterol, bitolterol, carbuterol, clembuterol, clorprenalina, denopamina, dioxetodrina, dobutamina (dobutrex), dopamina (intro-pin), dopexamina, efedrina, etafedrina, etilnorepinefrina, fenoterol, formoterol, hexoprenalina, ibopaminea, isoetarina, isoproterenol, mabuterol, metaproterenol, metoxifenamina, oxifedrina, pirbuterol, procaterol, protoquilol, reproterol, rimiterol, ritodrina, soterenol, terbutalina, tretoquinol, tulobuterol y xamoterol. Los ejemplos no limitativos de un inhibidor de la fosfodiesterasa incluyen amrinona (inocor).

iv. Agentes antianginosos

Los agentes antianginosos puede comprender organonitratos, bloqueantes de los canales de calcio, betabloqueantes y combinaciones de los mismos.

Los ejemplos no limitativos de organonitratos, también conocidos como nitrovasodilatadores, incluyen nitroglice-rina (nitro-bid, nitrostat), dinitrato de isosorbida (isordil, sorbitrate) y nitrato de amilo (aspirol, vaporole).

2. Agentes terapéuticos quirúrgicos

En ciertos aspectos, el agente terapéutico secundario puede comprender una intervención quirúrgica de algún tipo, que incluye, por ejemplo, intervención quirúrgica preventiva, diagnóstica o de clasificación de estadio, curativa y paliativa. Puede usarse una intervención quirúrgica, y en particular una intervención quirúrgica curativa, junto con otras terapias, tales como la presente invención y uno o más agentes distintos.

Los expertos en la técnica conocen bien tales agentes terapéuticos quirúrgicos para trastornos y enfermedades vasculares y cardiovasculares, y pueden comprender, pero no se limitan a, realizar una intervención quirúrgica en un organismo, proporcionar una prótesis mecánica cardiovascular, angioplastia, perfusión de la arteria coronaria, ablación de catéter, proporcionar un desfibrilador cardioversor implantable al sujeto, soporte circulatorio mecánico o una combinación de los mismos. Los ejemplos no limitativos de un soporte circulatorio mecánico que puede usarse en la presente invención comprenden un balón de contrapulsación intraórtica, dispositivo de asistencia ventricular izquierda o una combinación de los mismos.

IV. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la técnica deben apreciar que las técnicas dadas a conocer en los ejemplos que siguen representan técnicas que el inventor

ha descubierto que funcionan bien en la práctica de la invención, y por tanto puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deben, a la luz de la presente descripción, apreciar que pueden realizarse muchos cambios en las realizaciones específicas que se dan a conocer y todavía obtenerse un resultado parecido o similar sin apartarse del espíritu y el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Células transfectadas

A. Métodos

Se transfirieron de manera estable a fibroblastos de hámster chino (células CHW) ADNc humano con Arg389 y Gly389 tal como se describió anteriormente (Mason *et al.*, 1999). Se estudiaron líneas con niveles equivalentes de expresión determinados mediante unión de radioligando para determinar el efecto antagonista de bucindolol sobre la acumulación de AMPc estimulada por norepinefrina. Se trataron células en monocapas con norepinefrina 10 μ M en ausencia y presencia de varias concentraciones de bucindolol durante 20 min. a 37°C y se aisló [³H]AMPc mediante cromatografía en columna (Salomon, 1991).

B. Resultados: Respuesta a bucindolol en células transfectadas

Los niveles de expresión en células CHW de los receptores para los estudios de antagonismo funcional fueron de 123 $\pm$ 19 y 137 $\pm$ 16 fmol/mg para líneas celulares de Arg389 y Gly389, respectivamente. Se expusieron células a 10 μ M del agonista norepinefrina, en ausencia o presencia de concentraciones variables de bucindolol, y se determinaron los niveles de AMPc. Tal como se muestra en la figura 3, Arg389 presentó una mayor estimulación de AMPc frente a norepinefrina en ausencia de bucindolol en comparación con Gly389, lo que representa los fenotipos primarios de los dos receptores (Mason *et al.*, 1999). A pesar del sustancialmente mayor grado de estimulación mediada por norepinefrina del receptor con Arg389, bucindolol antagoniza eficazmente la respuesta. La diferencia en la disminución absoluta en la producción de AMPc proporcionada por bucindolol fue mayor para células que expresaban β 1-Arg389: bucindolol provocó una disminución máxima de 435 $\pm$ 80 fmol/ml de AMPc en células con Arg389 en comparación con 115 $\pm$ 23 fmol/ml de AMPc en células con Gly389 (P<0,008, N=4). No se encontró que la potencia del bucindolol fuera diferente para la respuesta (DE50=46 $\pm$ 4,5 y 35 $\pm$ 11 nM, respectivamente, P=0,94, N=4). En experimentos adicionales, bucindolol solo en concentraciones de hasta 10 μ M no provocó ninguna estimulación de AMPc en células que expresaban cualquier variante de receptor (datos no mostrados). Estos resultados indican por tanto que el receptor con Arg389 puede proporcionar una respuesta clínica mayor a bucindolol en el tratamiento de insuficiencia cardíaca.

Ejemplo 2

Respuesta al bloqueo β en ratones transgénicos

El uso del promotor de cadena pesada de α -miosina, se utilizaron ratones transgénicos con expresión ventricular dirigida de β 1AR humano (formas Arg389 y Gly389) para determinar respuestas específicas de alelo a la administración crónica de β -bloqueante propranolol. Los niveles de expresión de los dos receptores fueron equivalentes. Recientemente se ha notificado en detalle en otra parte la generación de estos ratones y su caracterización parcial (Perez *et al.*, 2003). Para los estudios actuales, se trataron ratones de 3 meses de edad de ambos genotipos, así como ratones no transgénicos, con propranolol (0,5 mg/ml) en su agua para beber, o agua sin propranolol (control) de manera continua durante 6 meses. Entonces se extrajeron los corazones y se prepararon extractos de proteína ventricular. Se sometieron a inmunotransferencia de tipo Western para determinar la expresión de las siguientes proteínas usando métodos descritos anteriormente (Perez *et al.*, 2003): Gas, Gai2, cinasa 2 del receptor acoplado a proteína G (GRK-2), adenilil ciclasa tipo 5 (AC5), fosfolamban total (T-PLN), fosfolamban fosforilado (P-PLN) y ATP-asa-2A de calcio del retículo sarcoplasmático y endoplasmático (SERCA). Se evaluó el efecto del tratamiento comparando la expresión de las proteínas de ratones sin tratar y tratados con propranolol, dentro del genotipo, mediante ANOVA. El estudio se aprobó por el comité para el cuidado y uso de animales de la Universidad de Cincinnati.

Tal como se notificó recientemente (Perez *et al.*, 2003), los ratones transgénicos con expresiones dirigidas de β 1-Gly389 o β 1-Arg389 en el corazón muestran múltiples alteraciones con el tiempo (observadas a tan sólo 6 meses de edad), en la expresión de ciertas proteínas de gestión de Ca⁺⁺ y señalización cardíaca. Para evaluar la posibilidad de una respuesta específica de genotipo frente al bloqueo β a largo plazo, se trataron ratones de 3 meses de edad que expresaban cada genotipo de β 1AR con placebo o β -bloqueante propranolol durante 6 meses, se extrajeron los ventrículos y se prepararon extractos de proteína. Se usaron inmunotransferencias de tipo Western para cuantificar la expresión de las proteínas indicadas, comparando los cambios en la expresión por tratamiento dentro de grupos de genotipo de β 1AR. Tal como se muestra en la figura 4, el tratamiento con propranolol no tuvo ningún efecto (P=0,67) sobre la expresión de las proteínas indicadas en corazones de ratones con Gly389. En cambio, se observó una respuesta global al tratamiento (o bien aumentos o bien disminuciones en la expresión) con el tratamiento con propranolol en corazones de ratones con Arg389 (P<0,002). Todas las direcciones de estas tendencias inducidas mediante bloqueo β , que incluyeron aumentos en Gas, P-PLN y T-PLN, y disminuciones en Gai y GRK2, se consideran respuestas bioquímicas reconstituyentes en el contexto del corazón hipertrofiado/con insuficiencia (Liggett, 2001). Entonces, tomados en conjunto, los perfiles de expresión de proteínas asociados con el bloqueo β crónico en este modelo de

ratón transgénico sugieren que puede esperarse una respuesta más favorable al β -bloqueante bucindolol en pacientes con insuficiencia cardíaca con β 1-Arg389 en comparación con aquéllos con el genotipo β 1-Gly389.

Ejemplo 3

Estudio clínico de bucindolol frente a placebo

A. Materiales y métodos

1. Población de pacientes

Se obtuvo el genotipo en los sitios polimórficos de β 1AR codificantes de pacientes que participaron en la evaluación de betabloqueante de ensayo de supervivencia (BEST), (Lowes *et al.*, 2002) y que dieron su consentimiento para subestudios de ADN. La inclusión en BEST fue desde el 31 de mayo de 1995 hasta el 31 de diciembre de 1998, el diseño del estudio se ha descrito en detalle en otra parte (BEST Trial Investigators, 2001; y Lowes *et al.*, 2002). En resumen, el estudio era un ensayo aleatorio, multicéntrico, controlado con placebo del β -bloqueante-vasodilatador no selectivo de 3ª generación bucindolol (Bristow, 2000) en 2708 pacientes con insuficiencia cardíaca de clase III/IV (BEST Trial Investigators, 2001). A los que recibieron principio activo se les administraron 3 mg de bucindolol dos veces al día durante la primera semana, y se les ajustó la dosis por incremento según se toleró de manera semanal hasta 50 mg dos veces al día (o 100 mg dos veces al día para pacientes que pesaban >75 kg). De los 2708 pacientes, 1040 dieron su consentimiento para el subestudio y se preparó ADN adecuado a partir de una muestra de sangre. El estudio se aprobó por el Comité de Supervisión de ADN de BEST y la Junta de Revisión Institucional de la Universidad de Cincinnati.

2. Genotipado

Se extrajo ADN de sangre completa usando técnicas convencionales (Jones, 1963). Se realizó el genotipado usando métodos exactamente tal como se describió en detalle anteriormente (Small *et al.*, 2002). Para el β 1AR, se trazaron las variaciones en los nucleótidos codificantes 145 y 1165, que corresponden a los aminoácidos 49 y 389. Estos alelos se designaron β 1-Ser49, β 1-Gly49 y β 1-Arg389, β 1-Gly389. Todas las muestras de ADN se genotiparon satisfactoriamente en el locus β 1AR-389 y 1030 se genotiparon satisfactoriamente en β 1AR-49.

3. Análisis estadístico

Los criterios de valoración principales fueron mortalidad por cualquier causa, hospitalizaciones que un comité de criterios de valoración (BEST Trial Investigators, 2001) estimó que se debían a insuficiencia cardíaca, y el criterio de valoración combinado de muerte u hospitalización por insuficiencia cardíaca. Las variantes en la posición de aminoácido 389 de β 1AR (Arg y Gly) se consideraron los genotipos principales que se planteó la hipótesis de que influían sobre la eficacia del β -bloqueante. Las variables clínicas continuas se notifican como media $\pm$ DE, y las comparaciones se realizaron mediante prueba de la t o pruebas de suma de rangos de Wilcoxon. Las variables categóricas se notifican como proporciones y las comparaciones se realizaron mediante pruebas de la chi cuadrado o exacta de Fisher. Se construyeron curvas de supervivencia acumulada mediante métodos de Kaplan-Meier (Kaplan *et al.*, 1958); y el software SAS(r) patentado, versión 6.12. Cary, NC: SAS Institute, 1996). Se usó el modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox para examinar los efectos del tratamiento estratificado por el genotipo indicado. Se ajustaron los resultados por edad, sexo, raza, y, según se indica, el polimorfismo de β 1-Gly49. Debido al número limitado de comparaciones, y a una hipótesis *a priori* que se basó en estudios celulares, transgénicos y otros en seres humanos (Kaplan *et al.*, 1958; y el software SAS (r) patentado, versión 6.12. Cary, NC: SAS Institute, 1996; Perez *et al.*, 2003; y Wagoner *et al.*, 2002), los valores de $P < 0,05$ se consideraron significativos, sin ajustes para comparaciones múltiples.

B. Resultados

Los resultados de las células transfectadas y ratones transgénicos hicieron que se obtuvieran genotipos de pacientes de BEST, un ensayo del β -bloqueante bucindolol en el tratamiento de insuficiencia cardíaca de clase III-IV que incluía una rama de placebo (BEST Trial Investigators, 2001). La mayoría de las características demográficas y clínicas de nivel inicial no eran estadísticamente diferentes entre los que participaron en el subestudio de ADN en comparación con los que no lo hicieron. Se observa particularmente que la edad, sexo, clase de NYHA y etiología de la insuficiencia cardíaca no eran diferentes. Se observaron diferencias menores y clínicamente insignificantes entre participantes del subestudio de ADN frente a no participantes en las frecuencias cardíacas de nivel inicial (-1,3 lpm), tensiones arteriales sistólicas (+1,7 mmHg), peso (+1,9 kg), FEVI (+0,9%) y porcentaje de no blancos (-5%). La frecuencia alélica global de Arg389 fue del 67%, que es similar a la frecuencia alélica notificada de este polimorfismo en la población general (Mason *et al.*, 1999) y en cohortes con insuficiencia cardíaca (Small *et al.*, 2002).

Las características de los pacientes agrupados por los genotipos de hipótesis principal (β 1AR-389) y tratamiento se proporcionan en la tabla 2. No hubo diferencias en edad, sexo, raza, etiología de la insuficiencia cardíaca, clase de NYHA, o FEVI de nivel inicial entre grupos estratificados por placebo, tratamiento con bucindolol, o genotipo. Como puede observarse, el número de individuos homocigotos para Gly389 era relativamente pequeño (52 con placebo, 42 con bucindolol). Por tanto, se compararon los homocigotos para Arg con los portadores de Gly (aquéllos que tienen o bien uno o bien dos alelos de Gly). Por tanto, las cuatro cohortes, agrupadas por tratamiento y genotipo, consistieron cada una en >200 sujetos (tabla 2).

TABLA 2

	Grupo de placebo N=525				Grupo de bucindolol N=515			
	Homocigoto para Arg N=236	Hetero- cigoto para Arg/Gly N=237	Homocigoto para Gly N=52	Portadores de Gly N=289	Homocigoto para Arg N=257	Heteroci- goto para Arg/Gly N=216	Homocigoto para Gly N=42	Portadores de Gly N=258
Edad - media (D.E.)	60,5 (11,8)	60,3 (12,4)	59,6 (13,2)	60,2 (12,5)	59,8 (11,8)	61,6 (12,0)	56,6 (14,2)	60,8 (12,5)
Sexo - N (%)								
Hombre	187 (79%)	183 (77%)	42 (81%)	225 (78%)	206 (80%)	173 (80%)	34 (81%)	207 (80%)
Mujer	49 (21%)	54 (23%)	10 (19%)	64 (22%)	51 (20%)	43 (20%)	8 (19%)	51 (20%)
Raza-N (%)								
No negra	212 (90%)	182 (77%)	33 (63%)	215 (74%)	215 (84%)	165 (76%)	26 (62%)	191 (74%)
Negra	24 (10%)	55 (23%)	19 (37%)	74 (26%)	42 (16%)	51 (24%)	16 (38%)	67 (26%)
Etiología-N (%)								
Isquémica	145 (61%)	137 (58%)	34 (65%)	171 (59%)	138 (54%)	129 (60%)	23 (55%)	152 (59%)
No isquémica	91 (39%)	100 (42%)	18 (35%)	118 (41%)	119 (46%)	87 (40%)	19 (45%)	106 (41%)
Clase funcional de NYHA-N (%)								
III	223 (94%)	217 (92%)	48 (92%)	265 (92%)	242 (94%)	194 (90%)	36 (86%)	230 (89%)
IV	13 (6%)	20 (8%)	4 (8%)	24 (8%)	15 (6%)	22 (10%)	6 (14%)	28 (11%)
% FEVI - media (D.E.)	23,3 (7,0)	24,2 (7,1)	23,6 (6,8)	24,1 (7,0)	23,4 (7,2)	23,7 (7,1)	22,6 (6,9)	23,5 (7,1)

Características de nivel inicial de pacientes en BEST estratificadas por tratamiento y genotipo. Los
datos son medias $\pm$ DE.

La supervivencia de pacientes tratados con placebo y bucindolol estratificados por genotipo β 1AR-389 se muestra en las figuras 5 y 6. Comparaciones individuales ajustadas para edad, sexo y raza revelaron que los pacientes tratados con bucindolol homocigotos para Arg389 tenían una supervivencia aumentada en comparación con pacientes tratados con placebo con Arg389 (razón de riesgo=0,62, IC del 95%=0,40 a 0,96, P=0,03). Por tanto, la mejora en la supervivencia debida a bucindolol en los pacientes con Arg389 ascendió al 38% con respecto al placebo. Esta misma comparación en portadores de Gly no reveló ninguna diferencia en curvas de supervivencia (razón de riesgo=0,90, IC del 95%=0,62 a 1,30, P=0,57), lo que indica que no hay respuesta al tratamiento con bucindolol. También hubo una influencia aparente del genotipo β 1AR sobre la respuesta de hospitalización por insuficiencia cardíaca a bucindolol (figura 5). Se observó una disminución de hospitalizaciones con tratamiento con bucindolol en pacientes homocigotos para Arg389 en comparación con pacientes con placebo con el mismo genotipo (razón de riesgo=0,64, IC del 95%=0,46-0,88, P=0,006). Los portadores de Gly389 no mostraron ningún beneficio del fármaco en comparación con placebo en cuanto a hospitalizaciones (razón de riesgo=0,86, IC del 95%=0,64 a 1,15, P=0,298). Para el desenlace combinado de hospitalizaciones por insuficiencia cardíaca o muerte, un efecto del tratamiento favorable asociado a bucindolol (figuras 5 y 7) era evidente para pacientes con Arg389 en comparación con placebo (razón de riesgo=0,66, IC del 95%=0,50 a 0,88, P=0,004), pero no era aparente en portadores de Gly389 tratados con bucindolol frente a placebo (razón de riesgo=0,87, IC del 95%=0,67 a 1,11, P=0,250). Los ajustes para las variantes de la posición 49 (β 1-Ser49, β 1-Gly49) no tuvieron ningún efecto significativo sobre ninguno de los resultados anteriores. Con tal ajuste (incluyendo edad, sexo y raza) la razón de riesgo para la supervivencia para homocigotos para β 1-Arg389 era de 0,62, IC del 95%=0,40 a 0,97, P=0,035; para portadores de β 1-Gly389 no permaneció ningún efecto del tratamiento aparente (razón de riesgo=0,89, IC del 95%=0,61 a 1,30, P=0,56). De manera similar, el ajuste para la posición 49 no tenía ningún efecto apreciable sobre las razones de riesgo para las hospitalizaciones: para homocigotos para Arg389 la razón de riesgo=0,63, IC del 95%=0,45 a 0,86, P=0,007; para portadores de Gly389 la razón de riesgo=0,85, IC del 95%=0,63 a 1,14, P=0,54. Los resultados para el desenlace combinado de muerte y hospitalizaciones estratificadas por el genotipo β 1-389 tampoco se modificaron por los genotipos β 1-49.

Ejemplo 4

30 *Riesgos de mortalidad asociados a simpaticolisis en algunos pacientes de BEST*

Las mediciones de norepinefrina en venas sistémicas como parte del protocolo central del ensayo BEST estuvieron entre los factores pronóstico de nivel inicial de la mortalidad más fuertes, asociándose Ln de norepinefrina con aumentos de 1,8 y 1,6 veces en el riesgo de mortalidad mediante análisis de una variable y de múltiples variables, respectivamente. De manera sorprendente, tal como se muestra a continuación, el cambio en norepinefrina a los 3 meses tenía una relación compleja con mortalidad que era dependiente del grupo de tratamiento. En el grupo tratado con bucindolol, pero no en el tratado con placebo, un número sustancial de pacientes (el 18% de la población de sujetos) mostró una disminución de niveles de norepinefrina que estaba asociada con un riesgo de mortalidad posterior 1,7 veces superior.

La mayoría de los estudios, pero no todos, indican que la actividad adrenérgica es un factor determinante principal del desenlace en la insuficiencia cardíaca crónica (ICC) (Cohn *et al.*, 1984; Kaye *et al.*, 1995; Isnard *et al.*, 2000; Rockman *et al.*, 1989). Además, la actividad adrenérgica cardíaca es el primer marcador neurohormonal que se eleva en sujetos con disfunción ventricular izquierda (Runquist *et al.*, 1997). Estas observaciones forman la piedra angular del fundamento para la terapia con β -bloqueante de la insuficiencia cardíaca (Bristow, 2000).

Por otro lado, el soporte adrenérgico es un mecanismo de compensación importante en la insuficiencia cardíaca, que sirve para mantener el rendimiento miocárdico en reposo en un intervalo relativamente normal (Port *et al.*, 2001). Cuando el impulso adrenérgico se reduce rápidamente en sujetos con insuficiencia cardíaca crónica puede empeorar la función miocárdica (Gaffney *et al.*, 1963), y los tratamientos que disminuyen sustancialmente el impulso adrenérgico pueden aumentar los acontecimientos adversos graves incluyendo la mortalidad (Cohen *et al.*, 2003; Swedberg *et al.*, 2002). Basándose en estas observaciones parece que la disminución farmacológica “simpaticolítica” de la actividad adrenérgica puede afectar a la historia natural de la insuficiencia cardíaca de manera bastante diferente del bloqueo β .

Aunque la actividad adrenérgica de nivel inicial se ha examinado en numerosos estudios de desenlace de ICC así como en ensayos clínicos (Benedict *et al.*, 1996; Swedberg *et al.*, 1996; Francis *et al.*, 1993; Anand *et al.*, 2003), hasta hace poco sólo se han investigado números relativamente pequeños de sujetos (normalmente cientos) en estos estudios (Anand *et al.*, 2003). Además, la relación del comportamiento temporal de norepinefrina como posible determinante de la historia natural sólo se ha examinado en otros dos ensayos (Swedberg *et al.*, 1990; Anand *et al.*, 2003) y nunca en un estudio controlado con placebo, de cohorte de ICC grande que emplea un potente agente anti-adrenérgico. Por tanto, se investigaron los efectos de niveles iniciales y cambios en la actividad adrenérgica sobre desenlaces clínicos en BEST, así como en la interacción de bucindolol, un β -bloqueante con propiedades simpaticolíticas sobre desenlaces clínicos.

A. Métodos

1. Protocolo clínico

El protocolo BEST y los principales desenlaces se han descrito anteriormente (Mason *et al.*, 1999; Small *et al.*, 2002). Debido a un retraso inicial en el establecimiento de los procedimientos, la recogida de muestras de sangre para determinar norepinefrina en todos los pacientes aleatorizados comenzó 6 meses después del inicio del ensayo. Como resultado, 2126 de los 2708 sujetos aleatorizados en BEST tenían al menos una muestra de norepinefrina de nivel inicial recogida y medida.

2. Mediciones y recogida de muestras de norepinefrina

Se extrajeron muestras de NE de venas periféricas en el nivel inicial, a los 3 y 12 meses mediante la inserción de una aguja con aletas de calibre 21 dentro de la vena del brazo y colocando al sujeto en una habitación tranquila en una posición en decúbito supino durante 30 minutos. Se descartaron los 3 ml de sangre iniciales, y luego se extrajeron 5 ml de sangre e inmediatamente se transfirieron a tubos de 5 ml previamente enfriados que contenían EDTA. En el plazo de 30 min. se separó el plasma y congeló a -70°C. Los centros enviaron las muestras en hielo seco a un laboratorio central (LabCorp, Raritan, NJ) cada 3 meses, en el que se almacenaron las muestras a -85°C y se sometieron a ensayo en el plazo de 3 semanas. Se midió la NE mediante HPLC-detección electroquímica usando el método Bio-Rad HPLC (Bio-Rad Laboratories Hercules, CA). El control de calidad incluyó las nuevas mediciones de todas las muestras con valores iniciales de <200 pg/ml o >2000 pg/ml, desde el 2º tubo almacenado; y midiendo de manera rutinaria (cada 20 muestras) cantidades conocidas.

3. Métodos estadísticos

Se presentan las medias y desviaciones estándar (DE) para datos continuos, y las proporciones o porcentajes para datos categóricos. Se usaron pruebas de la T o pruebas de suma de rangos de Wilcoxon para datos continuos, y la prueba de la chi cuadrado o exacta de Fisher para datos categóricos. Se usó un nivel alfa de 0,05 (bilateral, no ajustado) para indicar significación estadística.

Se usaron los niveles de norepinefrina en el nivel inicial, o el cambio a los 3 meses para predecir la supervivencia y el criterio de valoración combinado de mortalidad + hospitalización por ICC. Se analizaron inicialmente los datos absolutos y sometidos a transformación logarítmica. Debido a la falta de simetría en niveles de norepinefrina se usaron datos transformados con logaritmo natural (Ln) en modelos de regresión de riesgos proporcionales de Cox de múltiples variables.

Se usó un método basado en probabilidad máxima (Kalbfleisch *et al.*, 1980) para clasificar cambios en norepinefrina dentro de tres grupos para la predicción de mortalidad + hospitalización por ICC. Este método de reparto encuentra el fraccionamiento óptimo de valores de norepinefrina que maximiza la probabilidad del modelo de riesgos proporcionales de Cox resultante. Además, se usó un análisis de ranura cúbica flexible (Green *et al.*, 1994) para determinar la forma y el nivel de significación de la relación de los cambios en norepinefrina a los 3 meses con la supervivencia.

B. Resultados

1. Población del estudio

Los datos descriptivos de la población y demográficos de nivel inicial en sujetos en los cuales al menos se extrajo norepinefrina en el nivel inicial no fueron diferentes de la población del estudio completa (BEST Trial Investigators, 2001)

2. Datos de norepinefrina

Los valores medios de norepinefrina de nivel inicial fueron de 501 ± 316 pg/ml en el grupo de placebo (n=1061), y de 529 ± 370 pg/ml en el grupo de bucindolol (n=1065, p=0,061 frente a placebo). Mediante análisis de la t de datos emparejados a los 3 (p=0,0085) y 12 (p=0,0002) meses el grupo de placebo mostró un aumento estadísticamente significativo de norepinefrina, mientras que el grupo de bucindolol mostró una disminución significativa a los 3 meses (p=0,0001) y una tendencia (p=0,067) a disminuir a los 12 meses (figura 8). Los cambios entre grupos de norepinefrina fueron muy estadísticamente significantes a los 3 (p<0,0001) y 12 (p<0,0001) meses. En relación a los cambios en el grupo de placebo, la disminución de norepinefrina en el grupo de bucindolol fue del 19% y el 13% a los 3 y los 12 meses, respectivamente.

3. Norepinefrina de nivel inicial como factor pronóstico de mortalidad o el criterio de valoración combinado de mortalidad + hospitalización por ICC

La figura 9 representa las razones de riesgo para el riesgo de mortalidad total para valores de norepinefrina de nivel inicial, mediante cuartiles relativos al primer cuartil al que se le asigna una razón de riesgo (RR) de 1,0. Para la cohorte total y para cada grupo de tratamiento hay un aumento progresivo del riesgo de mortalidad con el aumento del cuartil. Se obtuvieron resultados similares para el criterio de valoración combinado de mortalidad + hospitalización por ICC (figura 10).

La tabla 3 facilita los análisis de una variable y de múltiples variables de norepinefrina de nivel inicial y otros posibles modificadores especificados previamente en el protocolo de la mortalidad. El Ln de norepinefrina proporcionó una RR de una variable (límites de confianza del 95%) de 1,82 (1,58-2,09), $p < 0,001$. En el análisis de múltiples variables el Ln de norepinefrina estuvo entre los factores pronóstico de la mortalidad más poderosos.

4. Cambio de norepinefrina como factor pronóstico de la mortalidad o el criterio de valoración combinado de mortalidad + hospitalización por ICC

En la tabla 4 se muestran las relaciones entre los cambios de cuartil de norepinefrina a los 3 meses con la posterior mortalidad o mortalidad + hospitalización por ICC, en las que las RR se calculan con respecto al 1^{er} cuartil de cambio. Se realizó el análisis de cuartiles para mantener el cambio/cuartil de norepinefrina igual en los grupos de placebo y de bucindolol, derivándose los puntos de corte de la cohorte total. Esto creó 2 cuartiles de reducción de norepinefrina (1^o y 2^o), y 2 de aumento de norepinefrina (3^o y 4^o). En la tabla 4 se facilitan tanto el cambio de norepinefrina absoluto en pg/ml como el cambio en % desde el valor de nivel inicial. Debido al efecto simpático de bucindolol hubo más pacientes con bucindolol en el 1^{er} cuartil y más pacientes con placebo en el 4^o cuartil.

Tal como puede observarse en la tabla 4, para el cambio absoluto de norepinefrina frente a la mortalidad, el grupo de placebo mostró una tendencia a aumentar el riesgo en el 4^o/1^{er} cuartil, con una RR de 1,38, ($p = 0,099$), y ninguna tendencia para diferencias en la mortalidad en el 2^o o 3^{er} cuartil con respecto al 1^o. Para la mortalidad + hospitalización por ICC, en el grupo de placebo el 4^o cuartil:1^o tiene una RR significativa de 1,46 ($p = 0,011$). En cambio, el grupo de bucindolol no mostró ninguna tendencia para un aumento del riesgo en el 4^o:1^{er} cuartil para cualquier desenlace clínico, sino una disminución del riesgo de mortalidad en el 3^{er} cuartil con respecto al 1^o ($RR = 0,66$, $p = 0,046$) y una tendencia ($p = 0,22$) para una disminución del riesgo en el 3^{er}:1^{er} cuartil para mortalidad + hospitalización por ICC.

Para el cambio en % de norepinefrina hubo aumentos o tendencias para aumentos de riesgo en el placebo, 3^{er}:1^{er} y 4^o:1^{er} cuartil, tanto para mortalidad como para mortalidad + hospitalización por ICC. En cambio, en el grupo de bucindolol no hubo tales tendencias para un aumento de la RR en el 3^{er} o 4^o cuartil con respecto al 1^o para cualquiera de los criterios de valoración clínicos, y de manera similar al cambio absoluto de norepinefrina hubo una tendencia para la disminución de RR (0,77) en el 3^{er}:1^{er} cuartil ($p = 0,21$).

La tabla 4 también muestra RR por el grupo de tratamiento expresadas como bucindolol:placebo, para cada cuartil de norepinefrina mediante cambio absoluto o en %. Para la mortalidad, la RR de bucindolol:placebo fue significativamente <unidad (reducción de la mortalidad por bucindolol en comparación con placebo) en el 3^{er} cuartil tanto para cambio absoluto ($RR = 0,63$) como en % ($RR = 0,53$) de norepinefrina. Para la mortalidad + hospitalización por ICC se observó un patrón similar, excepto porque las RR en el 4^o cuartil también se redujeron significativamente. Al contrario que para la mortalidad, para la mortalidad + hospitalización por ICC el 2^o cuartil produjo un aumento casi significativo ($p = 0,067$) en la RR de bucindolol:placebo para el cambio absoluto, y un aumento significativo ($p = 0,021$) ($RR = 1,39$) para el cambio en %.

Con el fin de explorar adicionalmente el riesgo de mortalidad diferencial asociado con el tratamiento asociado con el cambio de norepinefrina, se empleó un método basado en probabilidades (Bristow, 1984). Tal como se muestra en la figura 11, análisis de probabilidades separados dentro de cada grupo de tratamiento identificaron 11 sujetos en el grupo de placebo y 153 sujetos en el grupo de bucindolol que tenían riesgos superiores respectivos ($RR = 3,31$, $p = 0,004$; $RR = 1,69$, $p = 0,002$) de mortalidad posterior con reducción de norepinefrina a los 3 meses. La reducción de norepinefrina en estos grupos de riesgo fue de ≥ 783 pg/ml en el grupo de placebo, y $\geq 244,5$ pg/ml en el grupo de bucindolol. La figura 11 también ilustra que los subgrupos con un aumento de norepinefrina a los 3 meses se identificaron con un riesgo de mortalidad superior, en ambos grupos de tratamiento.

Debido a que el método basado en probabilidades proporciona una optimización máxima de los puntos de corte de cambio de norepinefrina que predicen un aumento de la mortalidad, se empleó un ajuste menos discriminatorio usando un ajuste de interpolación cúbica flexible (Fowler y Bristow, 1985). El mejor ajuste mediante este método fue una curva no lineal, en forma de U, con 5 nudos y 3 grados de libertad, con valores de Chi cuadrado respectivos para el grupo tratado con bucindolol, grupo tratado con placebo y la cohorte entera de 13,2 ($p = 0,0042$), y 11,1 ($p = 0,011$) y 32,5 ($p < 0,0001$).

5. Características de los sujetos con un aumento o disminución de norepinefrina asociado con aumento del riesgo de mortalidad

En la tabla 5 se muestran características de los subgrupos con alto riesgo de mortalidad identificados en ambos extremos del espectro de cambio de norepinefrina mediante análisis basado en probabilidades, en comparación con los grupos de cambio intermedio respectivos que sirven como controles. Los 153 sujetos en el subgrupo de bucindolol identificados con un riesgo de mortalidad superior con reducción de norepinefrina tenían niveles de norepinefrina de nivel inicial altos y una disminución promedio de norepinefrina a los 3 meses de 529 pg/ml. Estos sujetos también tenían FEVI y FEVD inferiores, y frecuencias cardíacas superiores en comparación con los grupos de control de cambio intermedio, que tenían poco o ningún cambio de norepinefrina (-44 pg/ml). Los 153 sujetos tratados con bucindolol con reducción marcada de norepinefrina también tenían un porcentaje superior de sujetos de clase IV, y una tendencia ($p=0,088$) hacia más sujetos negros frente a no negros en comparación con los grupos de cambio intermedio. De las 52 muertes que se produjeron en estos 153 sujetos, el 79% se clasificaron como cardíacas y el 63%, el 27% y el 2% se atribuyeron a muerte cardíaca repentina, fallo de bomba e infarto de miocardio, respectivamente. En cambio, el subgrupo tratado con bucindolol que tenía un riesgo de mortalidad superior asociado con un aumento de norepinefrina ($n=137$) tenía FEVD de nivel inicial inferiores, similares a FEVI de nivel inicial pero un aumento de FEVI significativamente menor a los 3 meses en comparación con el grupo de cambio intermedio. En este subgrupo el % de clase IV y la distribución de no negros/negros no se diferenciaron del grupo intermedio. En este subgrupo 35 de las 43 muertes fueron cardiovasculares, pero la minoría fueron repentinas (el 34% frente al 51% de fallo de bomba y el 6% debido a infarto de miocardio).

C. Discusión

Datos de norepinefrina de nivel inicial del ensayo BEST confirman y amplían informes previos de una relación positiva entre el nivel de activación adrenérgica y los desenlaces clínicos adversos. Los datos sobre norepinefrina de nivel inicial indican que este parámetro es un fuerte factor pronóstico de desenlaces clínicos como se identificó en una población con ICC. De manera sorprendente, en BEST el aumento del riesgo conferido por un nivel de norepinefrina de nivel inicial superior no disminuyó sustancialmente mediante terapia anti-adrenérgica, ya que las razones de riesgo de mortalidad o mortalidad + hospitalización por ICC aumentaron progresivamente con el aumento del cuartil de norepinefrina en los grupos de tratamiento tanto con bucindolol como con placebo. Una posibilidad de esta falta de efecto protector mediante bucindolol en los cuartiles de norepinefrina de nivel inicial superiores fue un efecto simpaticolítico que se producía en sujetos con la ICC más avanzada y el mayor grado de disfunción de miocardio.

Por otro lado, bucindolol confirió un efecto clínicamente protector en cuartiles de pacientes que mostraban un aumento de la actividad adrenérgica a los 3 meses. No se observó una reducción de este tipo en criterios de valoración clínicos en cuartiles de reducción de norepinefrina. De hecho, para la mortalidad + hospitalización por ICC, el 2º cuartil de reducción de norepinefrina mostró evidencias del aumento del riesgo en pacientes tratados con bucindolol. Además, cuando los cambios de cuartil de norepinefrina a los 3 meses se compararon con el 1º cuartil (que tenía el mayor grado de reducción) la relación 3º:1º cuartil mostró evidencias de un aumento de la mortalidad en el 1º cuartil para el grupo de bucindolol, pero no para el grupo de placebo. Estas sugerencias de un efecto adverso de bucindolol en pacientes que mostraban una reducción de norepinefrina a los 3 meses provocaron análisis adicionales de los efectos simpaticolíticos de este agente β -bloqueante único.

En comparación con placebo, bucindolol redujo la norepinefrina en un 19% a los 3 meses. Esto se compara con una reducción relativa del 24% de norepinefrina a los 3 meses por el agente simpaticolítico central, moxonidina, en el ensayo MOXCON (Cohn *et al.*, 2003). Como en MOXCON, los efectos simpaticolíticos del bucindolol parecieron estar asociados con un aumento del riesgo de desenlaces clínicos adversos, particularmente de muerte repentina. Además de la evidencia dentro de cuartiles de reducción de norepinefrina tratada anteriormente, análisis basados en probabilidades identificaron al 18% del grupo de bucindolol con una reducción marcada de norepinefrina (de >224 pg/ml) que tenían un riesgo de mortalidad aumentado 1,65 veces, mientras que sólo se identificó al 1% de los pacientes tratados con placebo como que tenían un aumento del riesgo de mortalidad con una reducción marcada de norepinefrina. Este análisis también reveló un aumento del riesgo de mortalidad en pacientes con un aumento de norepinefrina, pero en números similares de pacientes tratados con bucindolol y con placebo. El aumento del riesgo de mortalidad en ambos extremos del espectro de cambio de norepinefrina a los 3 meses se confirmó mediante ajuste de interpolación cúbica flexible, que produjo una curva en forma de U estadísticamente significativa para los grupos tratados tanto con bucindolol como con placebo.

El subgrupo de sujetos tratados con bucindolol con una reducción de norepinefrina identificada por análisis de probabilidades como que tenían un aumento del riesgo de mortalidad estaba comprendido por pacientes con insuficiencia cardíaca más avanzada (clase IV frente a III), niveles de norepinefrina de nivel inicial superiores, función de VI y VD más deprimida, y una tendencia a una mayor proporción de sujetos negros frente a sujetos no negros. Por tanto, los efectos simpaticolíticos de bucindolol condujeron posiblemente a desenlaces adversos en un subconjunto de sujetos con disfunción de miocardio grave que posiblemente dependían de actividad adrenérgica para el soporte funcional cardíaco, pero tal mecanismo no se ha demostrado mediante estos datos y otras explicaciones son posibles.

Los únicos datos de ensayos clínicos anteriormente publicados sobre la relación de cambios en la actividad adrenérgica sistémica con respecto a desenlaces son de CONSENSUS (Swedberg *et al.*, 1990), en el que cambios neurohormonales a las 6 semanas no estaban relacionados con el desenlace en 239 sujetos, y Val-HeFT (Anand *et al.*, 2003) en el que en 4301 pacientes los cambios absolutos de norepinefrina a los 4 meses no predijeron, pero los cambios en % sí que predijeron, diferencias en la mortalidad posterior en los grupos tratados tanto con placebo como con valsartan. Sin embargo, a diferencia de Val-HeFT, se encontró una relación positiva entre el aumento de los niveles absolutos de norepinefrina y el aumento del riesgo de mortalidad o de mortalidad + hospitalización por ICC. El principal nuevo hallazgo del estudio actual es que tanto las disminuciones como los aumentos de la actividad adrenérgica pueden asociarse con desenlaces clínicos adversos en una población con insuficiencia cardíaca crónica. El efecto atenuante de bucindolol sobre estos riesgos indica que los efectos adversos de los aumentos de norepinefrina pueden anularse mediante administración concurrente de terapia anti-adrenérgica, a diferencia de los riesgos conferidos por norepinefrina de nivel inicial medida antes de iniciar la terapia.

En resumen, una investigación exhaustiva de la actividad adrenérgica sistémica estimada a partir de niveles de norepinefrina en venas periféricas medidos en el ensayo BEST indica que en ICC avanzada 1) la norepinefrina de nivel inicial es un factor pronóstico de desenlaces clínicos adversos pero no de la respuesta terapéutica, 2) tanto el aumento como la disminución de norepinefrina a los 3 meses predicen desenlaces adversos, y 3) bucindolol atenúa el riesgo de aumentos de norepinefrina, pero mediante sus propiedades simpaticolíticas pone a determinados tipos de pacientes en riesgo clínico de reducciones de norepinefrina.

TABLA 3

Análisis de múltiples variables de NE de nivel inicial

Covariable	Razón de riesgo (IC del 95%)	Valor de P
Ln NE como univariable	1,82 (1,58-2,09)	<0,001
Análisis de múltiples variables		
Ln NE	1,61 (1,40-1,85)	<0,001
CAD (CAD frente a no CAD)	1,68 (1,42-2,01)	<0,001
FEVI ($\leq 20\%$ frente a $> 20\%$)	1,46 (0,25-1,71)	<0,001
Raza (negra frente a no negra)	1,26 (1,04-1,50)	0,016
Sexo (hombre frente a mujer)	1,04 (0,84-1,28)	0,724
NYHA (IV frente a III)	1,61 (1,28-2,01)	<0,001

ES 2 345 993 T3

TABLA 4

Efecto del cambio de norepinefrina (NE) a los 3 meses sobre la mortalidad posterior (M) o la mortalidad + hospitalización por ICC (M+H) en los grupos de placebo y de bucindolol, y efectos del tratamiento con bucindolol en comparación con placebo mediante cuartil de cambio de norepinefrina, razón de riesgo e (intervalos de confianza del 95%)

Cambio de NE	Razones de riesgo de mortalidad por cuartil de cambio de NE con respecto al 1 ^{er} cuartil			Mortalidad en bruto (%) y razones de riesgo de bucindolol/placebo por cuartil de cambio de NE			
	2°/1°	3°/1°	4°/1°	1°	2°	3°	4°
Absoluto, pg/ml							
Placebo (P):	0,98	1,01	1,38	24,5	27,2	27,5	37,5
M	(0,65-1,48)	(0,68-1,51)	(0,94-2,03)				
M+H	1,21	1,11	1,46				
	(0,89-1,64)	(0,82-1,50)	(1,09-1,96)				
Bucindolol (B):	0,99	0,66	1,15	26,1	25,7	17,7*	28,6
M	(0,70-1,41)	(0,43-0,99)	(0,80-1,65)				
M+H	1,00	0,83	1,10				
	(0,75-1,32)	(0,61-1,12)	(0,82-1,47)				
B/P:	-	-	-	0,96	0,98	0,63	0,80
M				(0,65-1,43)	(0,68-1,43)	(0,41-0,96)	(0,57-1,14)
M+H				1,19	1,30	0,58	0,74
				(0,88-1,61)	(0,98-1,72)	(0,43-0,78)	(0,56-0,98)
Cambio en %							
Placebo (P):	1,21	1,42	1,37	23,1	27,3	32,1	29,2
M	(0,80-1,84)	(0,96-2,10)	(0,92-2,04)				
M+H	1,27	1,33	1,35				
	(0,93-1,72)	(0,99-1,78)	(1,00-1,81)				
Bucindolol (B):	1,14	0,77	1,19	25,2	26,0	18,8	29,1
M	(0,80-1,62)	(0,51-1,16)	(0,83-1,71)				
M+H	1,18	0,91	1,18				
	(0,89-1,56)	(0,67-1,24)	(0,88-1,58)				
B/P:	-	-	-	1,03	0,98	0,56	0,90
M				(0,69-1,54)	(0,68-1,42)	(0,38-0,84)	(0,63-1,29)
M+H				1,34	1,39	0,65	0,66
				(0,84-1,54)	(1,05-1,85)	(0,48-0,88)	(0,50-0,88)

Los cuartiles son: cambio absoluto de NE en pg/ml, 1° <-144 (placebo n=155, bucindolol n=268), 2° -144 a <-9 (placebo n=206, bucindolol n=214), 3° -9 a 111 (placebo n=236, bucindolol n=186), 4° >111 (placebo n=248, bucindolol n=173); cambio de NE en %, 1° <-30,2 (placebo n=160, bucindolol n=262), 2° -30,2 a <-2,5 (placebo n=198, bucindolol n=223), 3° -2,5 a 31,1 (placebo n=240, bucindolol n=181), 4° >31,1 (placebo n=247, bucindolol n=175). *, p<0,05 frente al 1^{er} cuartil, prueba exacta de Fisher.

ES 2 345 993 T3

TABLA 5

Características demográficas de subgrupos determinados por probabilidad con aumento del riesgo asociado con cambios (Δ) de norepinefrina (NE, en pg/ml) mediante reducciones (Reducc.) o aumentos (Aum.) frente a los subgrupos de cambio de NE intermedio (Inter.). NE está en pg/ml; datos en media $\pm$ DE; *, $p < 0,05$ frente a Inter.; #, $p < 0,10$ frente a Inter.

Parámetro	Placebo			Bucindolol		
	Reducc. (ΔNE ≤ -783)	Inter. (ΔNE > -783, ≤362)	Aum. (ΔNE >362)	Reducc. (ΔNE ≤ -244,5)	Inter. (ΔNE -244,5, ≤+145)	Aum. (ΔNE >145)
Numero de sujetos	n=11	n=762	n=72	n=153	n=551	n=137
NE de nivel inicial, pg/ml	1500 ⁺ ±405	464 ± 245	514 ± 328	932 ⁺ ± 544	422 ± 189	409 ± 199
Cambio de NE a los 3 meses, pg/ml	-1024 ⁺ ± 220	-16 ± 188	642 ⁺ ± 335	-529 ⁺ ± 458	-44 ± 103	326 ⁺ ± 244
Cambio de NE a los 12 meses, pg/ml	-667 ⁺ ± 528	45 ± 268	297 ⁺ ± 560	-349 ⁺ ± 347	17,5 ± 216	161 ⁺ ± 246
Número de muertes (%)	6 (55%) [*]	200 (26%)	34 (47%) [*]	52 (34%) [*]	114 (21%)	43 (31%) [*]
Edad (años)	63,6 ±9,8	60,3 ± 11,9	64,7 ⁺ ± 10,8	60,1 ± 12,2	60,7 ± 12,1	62,0 ± 12,7
Sexo (%H/M)	64/36	80/20	82/18	79/21	81/19	82/18
Raza (%no negra/negra)	73/27	80/20	82/18	74/26 [#]	80/20	77/23
Clase NYHA (%III/IV)	82/18	92/8	83/17 [*]	86/14 [*]	93/7	93/7
Duración de ICC, meses, mediana	73,0 [#]	39,0	36,0	36,0	36,0	31,0

ES 2 345 993 T3

	Etiología (%)	45/55	42/58	29/71 [*]	46/54	42/58	31/69 [*]
5	no isquémicos/ isquémicos)						
	Frecuencia cardiaca de nivel inicial (FC, LPM)	79,2 ± 12,4	81,6 ± 12,8	78,3 [*] ± 12,3	85,5 [*] ± 13,8	81,0 ± 13,0	80,6 ± 13,7
10	Cambio de FC a los 3 meses	-5,5 ± 17,0	-2,3 ± 12,5	1,0 [*] ± 13,3	-13,6 [*] ± 14,8	-9,7 ± 12,4	-7,1 [*] ± 12,8
15	Cambio de FC a los 12 meses	-10,7 [#] ± 13,2	-2,6 ± 13,5	-1,8 ± 13,5	-12,6 [*] ± 14,4	-7,9 ± 13,5	-8,1 ± 14,6
20	TA sistólica (TAS, mmHg)	111 ± 20	118 ± 18	116 ± 19	116 ± 19	118 ± 18	120 ± 18,2
25	Cambio de TAS a los 3 meses	4,7 ± 13,8	0,0 ± 15,4	-0,1 ± 18,1	-0,7 ± 18,2	-0,5 ± 15,7	-4,7 [*] ± 16,4
30	Cambio de TAS a los 12 meses	5,6 ± 19,5	0,7 ± 18,1	1,9 ± 21,0	2,7 ± 20,1	0,7 ± 18,0	-0,9 ± 16,8
35	FEVI, unidades de FE (UFE como %)	22,8 ± 6,6	23,1 ± 7,2	23,3 ± 7,6	20,1 [*] ± 8,0	24,1 ± 7,0	23,3 ± 6,7
40	Cambio de FEVI a los 3 meses, UFE	0,2 ± 6,4	2,3 ± 6,6	0,6 ⁺ ± 7,2	7,0 [#] ± 8,4	5,7 ± 7,9	4,2 ⁺ ± 7,0
45	Cambio de FEVI a los 12 meses, UFE	5,7 ± 11,9	3,3 ± 8,7	1,4 ± 7,6	8,8 ± 9,2	7,3 ± 10,4	7,1 ± 8,8

Ejemplo 5

Prevalencia de variantes genéticas de receptor adrenérgico A2C en BEST

La tabla a continuación proporciona la prevalencia (%) de variantes genéticas de receptor adrenérgico α_{2C} (WT/WT=homocigoto para tipo natural, WT/DEL=heterocigoto, DEL/DEL=homocigoto para α_{2C} Del322-325) en BEST, en comparación con la presentada originalmente por el grupo de Liggett (Small *et al.*, 2002). Se evaluaron muestras de BEST usando cebadores para amplificar mediante PCR una región de la secuencia de α_{2C} AR que cubre la delección y después corriendo la reacción de amplificación sobre un gel que podía resolver una diferencia de 12 pares de bases de longitud entre productos con o sin la delección.

TABLA 6

Estudio	Sujeto no negro			Sujeto negro			Cohorte entera		
	WT / WT	WT / DEL	DEL / DEL	WT / WT	WT / DEL	DEL / DEL	WT / WT	WT / DEL	DEL / DEL
BEST	91,6	8,2	0,2	33,8	47,8	18,4	80,0	16,1	3,9
Small <i>et al.</i> , ICC	86,4	6,2	7,4	29,5	17,9	52,6	58,5	11,9	29,6
Small, controles	94,3	3,8	1,9	34,5	48,8	16,6	67,7	23,8	8,5

Tal como se puede observar en la tabla anterior, la frecuencia del alelo α_{2c} Del322-325 es mucho mayor en poblaciones de sujetos negros frente a no negros, en BEST 0,423 frente a 0,043 ($p < 0,0001$). En segundo lugar, en sujetos negros en BEST la frecuencia alélica de α_{2c} Del322-325 no es tan alta como en pacientes con negros con ICC de Small *et al.* (0,615, $p < 0,0001$), pero es similar a la de controles de sujetos negros en Small *et al.* (0,411, $p = 0,85$). Estas diferencias reflejan probablemente los tamaños de muestra relativamente pequeños en Small *et al.* ($n = 78$ pacientes negros con ICC, 84 controles de sujetos negros) y el ensayo BEST ($n = 207$ sujetos negros en el subestudio de ADN).

En seres humanos sólo se ha supuesto el aumento de impulso adrenérgico asociado con el polimorfismo α_{2c} Del322-325, y no se ha investigado directamente.

Una posible razón para la pequeña diferencia en norepinefrina de nivel inicial entre homocigotos para α_{2c} Del322-325 y controles de α_{2c} de tipo natural que se trata directamente en esta propuesta, es que la norepinefrina en venas sistémica no es un buen indicador sustituto del impulso adrenérgico cardíaco, y en la insuficiencia cardíaca crónica pueden producirse cambios en el impulso adrenérgico cardíaco en ausencia de cambios de norepinefrina sistémica.

Los resultados de norepinefrina de nivel inicial y cambio de norepinefrina a los 3 meses por el tipo de receptor α_{2c} se muestran en la tabla 7:

TABLA 7

Norepinefrina (NE), media $\pm$ DE, y (n) del ensayo BEST, por el tipo de receptor α_{2c} ; $^*p < 0,05$ frente a cambio de placebo

Tipo de receptor α_{2c}	NE de nivel inicial, pg/ml	Cambio de NE (pg/ml) a los 3 meses		
		Placebo	Bucindolol	Todos
Heterocigoto u homocigoto para α_{2c} de tipo natural	479 $\pm$ 264 (710)	12 $\pm$ 274 (305)	-50* $\pm$ 227 (304)	-19 $\pm$ 254 (609)
Homocigotos para α_{2c} Del322-325	521 $\pm$ 350 (161)	51 $\pm$ 323 (60)	-153* $\pm$ 468 (67)	-57 $\pm$ 417 (127)

Tal como se observa en la tabla 7, los niveles de nivel inicial o cambio de NE en vena sistémica en BEST respaldan fuertemente las hipótesis anteriormente citadas referentes a los efectos de la variante de receptor α_{2c} Del322-325 sobre el impulso adrenérgico de nivel inicial; sólo hay una tendencia no significativa a favor de los homocigotos

para α_{2C} Del322-325 para una norepinefrina de nivel inicial superior a los 3 meses. Por otro lado, en la tabla 7 puede apreciarse fácilmente que la disminución de norepinefrina con bucindolol es mucho mayor en homocigotos para α_{2C} Del322-325 que en heterocigotos u homocigotos para α_{2C} tipo natural.

Ejemplo 6

Ampliación de los Ejemplos 3 y 4

A. Materiales y métodos

1. Estudios ventriculares en seres humanos *ex vivo*

Se obtuvieron corazones sin insuficiencia de donantes de órganos potenciales locales cuyos corazones no se transplantaron debido a incompatibilidad física o del tipo de sangre ABO. Los corazones con insuficiencia eran de pacientes con insuficiencia cardíaca en fase terminal debida a cardiomiopatías dilatadas isquémicas o no isquémicas que se sometieron a trasplante de corazón. Las características demográficas de los corazones se proporcionan en los resultados. La respuesta contráctil de trabéculas humanas aisladas, estimuladas por campo, se evaluó tal como se describió anteriormente {1755; a-c}. Se montaron trabéculas de tamaño uniforme (de 1 a 2 x de 6 a 8 mm) en cámaras de baño muscular de 80 ml en disolución de Tyrode a pH 7,45 burbujeada con 95% de O₂-5% de CO₂ a 36°C. Después del equilibrio, se aplicó una tensión del 75% de Lmax a cada trabécula individual. Luego se aplicó la estimulación de campo mediante pulsos de 5 ms al 10% por encima del umbral, y después del equilibrio se realizaron curvas de dosis-respuesta completas de isoproterenol, bucindolol o xamoterol usando las concentraciones indicadas y la aplicación de dosis crecientes cada 5 minutos. En experimentos en los que se usó forskolina para potenciar la transducción de señal {e,f}, se aplicaron 10⁻⁶ M de este activador de adenilil ciclase a los baños tisulares 15-20 minutos antes de realizar las curvas de dosis-respuesta, y permitió alcanzar la estabilidad de la respuesta a la tensión. Se calculó la tensión sistólica a cada dosis como la tensión estimulada en mN/mm² menos la tensión de nivel inicial. Se calcularon la tensión máxima, la concentración de isoproterenol que produjo el 50% de la tensión máxima desarrollada (CE₅₀) y la pendiente de la curva mediante análisis de covarianza de medidas repetidas no lineales. Se usó una pendiente de curva positiva o negativa estadísticamente significativa de datos agrupados para identificar efectos inotrópicos positivos o negativos, respectivamente, y se detectaron diferencias en la pendiente de la curva entre grupos de genotipos mediante una prueba para determinar la interacción. Se emplearon métodos estadísticos tal como se describió en los ejemplos 3 y 4.

2. Células transfectadas, unión de radioligando, ensayos de AMPc

Se transfectaron de manera estable fibroblastos de hámster chino usando constructos anteriormente descritos para expresar separadamente los receptores β_1 -Arg389 o β_1 -Gly389 humanos. Se determinaron la expresión de β_1 AR y la afinidad al bucindolol mediante estudios de unión de radioligandos con ¹²⁵I-cianopindolol (¹²⁵I-CYP), utilizando propranolol 1 μ M para definir la unión no específica, tal como se describe. Se llevaron a cabo estudios de acumulación de AMPc en células completas mediante el método de [³H]-adenina usando dos líneas con niveles de expresión equivalentes de los dos receptores tal como se indicó. Se expusieron las células unidas a vehículo (basal), norepinefrina 10 μ M o norepinefrina 10 μ M con las concentraciones indicadas de bucindolol durante 15 min. a 37°C.

B. Resultados

1. Las respuestas contráctiles *ex vivo* del ventrículo humano se correlacionan con el genotipo de β_1 AR

En estos estudios, se usaron trabéculas de ventrículo derecho aisladas de corazones humanos para determinar los efectos del genotipo sobre la contracción usando el tejido relevante, bajo expresión endógena, en ausencia y presencia de insuficiencia ventricular. La FEVI previa al explante en el grupo sin insuficiencia fue de 0,61 ± 0,13 para Arg y de 0,53 ± 0,15 para Gly, y en el grupo con insuficiencia = 0,21 ± 0,11 para Arg y 0,17 ± 0,07 para Gly. Cinco de cada 11 pacientes con insuficiencia con Arg y seis de cada 11 pacientes con insuficiencia con Gly tenían cardiomiopatías dilatadas isquémicas, teniendo todos los demás corazones con insuficiencia cardiomiopatías dilatadas no isquémicas. Las edades de los corazones sin insuficiencia fueron: Arg 39 ± 16 años, Gly 43 ± 20 años (p=0,64). Para los corazones con insuficiencia las edades fueron: Arg 48 ± 15 años, Gly 54 ± 8 años (p=0,26). La distribución de sexo en los corazones sin insuficiencia fue de 3 hombres y 8 mujeres en Arg, y 5 hombres y 6 mujeres en Gly. En corazones con insuficiencia la distribución de sexo fue de 8 hombres y 3 mujeres en Arg, y 2 hombres y 9 mujeres en Gly. En la figura 12 se muestran respuestas de tensión sistólica al isoproterenol en trabéculas de ventrículo derecho extraídas de corazones humanos con insuficiencia y sin insuficiencia, estratificadas por el genotipo de β_1 AR-389. En corazones sin insuficiencia, las respuestas difirieron entre los genotipos, siendo las tensiones máximas superiores para homocigotos para β_1 -Arg389 (13 ± 2,5 frente a 5,2 ± 1,4 mN/mm² para portadores de β_1 -Gly389, P=0,01). De manera importante, este mismo fenotipo, con una diferencia relativa específica del alelo incluso superior, se observó en trabéculas de corazones con insuficiencia: las tensiones máximas estimuladas por isoproterenol fueron de 9,4 ± 1,9 mN/mm² para β_1 -Arg389 y de 2,4 ± 0,60 mN/mm² para β_1 -Gly389 (P=0,008).

Se usó un segundo grupo de 23 corazones con insuficiencia para evaluar los efectos inotrópicos del bucindolol, el agonista parcial selectivo de β_1 -AR xamoterol {d}, e isoproterenol en trabéculas de ventrículo derecho aisladas. El promedio de la FEVI de este grupo era de $0,18 \pm 0,09$, con 10 cardiomiopatías dilatadas no isquémicas y 13 isquémicas. La edad promedio era de 52 ± 11 , y había 20 hombres y 3 mujeres. Trece de los 23 corazones eran homocigotos para Arg389, mientras que 10 eran portadores de Gly (todos heterocigotos). No hubo diferencias entre homocigotos para Arg y portadores de Gly con respecto a la FEVI, edad, etiología de la cardiomiopatía y sexo. En 8 de los 23 corazones se realizaron experimentos con bucindolol y xamoterol; en los otros 15 corazones se realizaron curvas de dosis-respuesta o bien de xamoterol o bien bucindolol sin el otro agente. En los 23 corazones se realizaron curvas de dosis-respuesta de isoproterenol completas.

Los resultados de la respuesta a la dosis de isoproterenol entre los dos grupos de genotipo fueron bastante similares a los resultados mostrados en la figura 12. En datos no mostrados, hubo una marcada diferencia en la respuesta a la dosis a favor del genotipo Arg/Arg, con diferencias sumamente significativas ($p < 0,001$) en la pendiente de la curva mediante pruebas para determinar la interacción y una diferencia en los máximos (Arg, xxxx; Gly, yyyy, $p < 0,05$). Tal como se puede observar en la figura 3, bucindolol solo produjo un efecto inotrópico negativo en ambos grupos de genotipos (pendientes negativas en ambos, ambos valores de $p < 0,01$, prueba no significativa para la interacción entre las pendientes de las curvas). En presencia de un tratamiento previo con forskolina los corazones con Arg conservaron una pendiente de la curva negativa ($P < 0,05$), pero la pendiente de la curva de dosis-respuesta de Gly no fue diferente de 0 ($p = 0,25$). En ausencia de forskolina (figura 13C), xamoterol produjo un efecto inotrópico positivo en los corazones con Arg, pero un efecto inotrópico negativo en trabéculas con Gly (ambos valores de p de las pendientes $< 0,05$). Xamoterol, cuando se aplicó con un tratamiento previo con forskolina, produjo un efecto inotrópico positivo en ambos grupos de genotipos (pendientes de curva positivas en ambos genotipos, $p < 0,05$), teniendo los corazones con Arg/Arg un mayor efecto inotrópico que alcanzó la significación en comparación con el nivel inicial a dosis de xamoterol de 3×10^{-8} M y 10^{-7} M.

2. Antagonismo funcional de AMPc estimulado con NE en células transfectadas

Para estos estudios se usaron células que expresaban niveles equivalentes (fmol/mg, $n=4$) de β_1 AR humanos con Arg389 (123 ± 19) y Gly389 (137 ± 16). Los niveles basales de AMPc fueron de $72 \pm 8,5$ y $59 \pm 9,1$ fmol/pocillo. Experimentos de acumulación de AMPc inicial en presencia de bucindolol hasta $10 \mu\text{M}$ no muestran ninguna evidencia de actividad simpaticomimética intrínseca (ASI) en cualquier receptor. Para examinar el antagonismo funcional, se expusieron las células a $10 \mu\text{M}$ de antagonista norepinefrina, en ausencia o presencia de diversas concentraciones de bucindolol, y se determinaron los niveles de AMPc. Tal como se muestra en la figura 13, Arg389 presentó una mayor estimulación de AMPc frente al agonista en ausencia de bucindolol en comparación con Gly389, lo que representa los fenotipos principales de los dos receptores tal como se indicó anteriormente [998]. A pesar del grado sustancialmente mayor de estimulación mediante NE del receptor con Arg389, bucindolol antagonizó eficazmente la respuesta. La diferencia en la disminución absoluta en la producción de AMPc proporcionada por bucindolol fue mayor para células que expresaban β_1 -Arg389: bucindolol provocó una disminución máxima de 435 ± 80 fmol/ml de AMPc en células con Arg389 en comparación con 115 ± 23 fmol/ml de AMPc en células con Gly389 ($p=0,008$, $n=4$). No se encontró que la potencia de bucindolol fuera diferente para la respuesta ($\text{CE}_{50}=46 \pm 4,5$ y 35 ± 11 nM, respectivamente, $P=0,94$, $n=4$). Además, en estudios de unión competitiva de ^{125}I -CYP la afinidad al bucindolol no fue diferente entre receptores con β_1 -Arg389 ($\text{pK}_i=9,6 \pm 0,04$) y con β_1 -Gly389 ($\text{pK}_i=9,6 \pm 0,11$, $n=3$). Estos hallazgos indican que el bucindolol puede antagonizar la respuesta potenciada de β_1 -Arg389.

3. Mecanismo de la ventaja terapéutica del genotipo Arg389

El aumento de la actividad adrenérgica, normalmente identificada por los niveles de norepinefrina en venas sistémicas elevados, soporta la función miocárdica comprometida en pacientes con insuficiencia cardíaca pero contribuye al avance de la insuficiencia cardíaca {h}. Esta compleja relación entre la actividad adrenérgica y los desenlaces se observó en BEST, en el que un aumento de norepinefrina de nivel inicial se asoció independientemente con desenlaces adversos, pero una retirada marcada de activación adrenérgica se asoció con un aumento de la mortalidad {i}. Al contrario que otros β -bloqueantes que se han usado para tratar la insuficiencia cardíaca, bucindolol tiene propiedades simpaticolíticas potentes, y en BEST el 18% de los pacientes tratados con bucindolol mostraron disminución exagerada de norepinefrina a los tres meses asociada con un aumento de 1,7 veces del riesgo de mortalidad posterior {i}, lo que recuerda al aumento de la mortalidad de pacientes en el ensayo MOXCON tratados con el agente simpaticolítico puro moxonidina {j}. Aunque el aumento del riesgo de mortalidad de simpaticolisis exagerada no se entiende completamente, supone probablemente pérdidas del soporte de contractilidad mediado adrenérgicamente al corazón con insuficiencia. Por tanto, los pacientes que son homocigotos para Arg pueden posiblemente tolerar la pérdida de señalización de norepinefrina mejor que portadores de Gly, debido a que, tal como se muestra en las figuras 12 y 13, incluso niveles bajos de agonista catecolamina producen un aumento presente en homocigotos para Arg. El otro mecanismo mediante el cual los homocigotos para Arg pueden conseguir una ventaja terapéutica al tratamiento con bucindolol sería un antagonismo de mayor grado de la señalización adversa de β_1 -AR, tal como queda implícito en la figura 3. Con el fin de determinar cuál de estos mecanismos puede representar el efecto terapéutico más favorable de bucindolol en homocigotos para Arg frente a portadores de Gly, los inventores compararon los efectos sobre la mortalidad mediante norepinefrina de nivel inicial y cambio de norepinefrina a los 3 meses (tabla 8). Tal como se puede

observar en la tabla 8, la razón de riesgo de homocigotos para Arg con respecto a portadores de Gly para la mortalidad disminuye al aumentar la norepinefrina de nivel inicial, lo que sugiere una ventaja progresiva para homocigotos para Arg tratados con bucindolol al aumentar el impulso adrenérgico. Para el análisis del cambio de norepinefrina, los inventores compararon la mortalidad en homocigotos para Arg con portadores de Gly en grupos anteriormente identificados como que tenían un riesgo aumentado de mortalidad en relación con una reducción marcada (de >244 pg/ml a los tres meses de terapia) de norepinefrina, un grupo de referencia con poco o ningún cambio de norepinefrina (de -244 a 145 pg/ml) que no estaba en riesgo de aumento de mortalidad, y un grupo con riesgo aumentado de mortalidad debido a un aumento de norepinefrina (de >145 pg/ml). Tal como se puede observar en la tabla 8, no existe ninguna ventaja para homocigotos para Arg en el subgrupo con un riesgo aumentado de mortalidad por simpaticolisis exagerada (grupo 1); la razón de riesgo de 1,07 indica una ventaja despreciable de portadores de Gly en este grupo. Por otro lado, en cuanto a norepinefrina de nivel inicial, hay una razón de riesgo decreciente al aumentar una subida de norepinefrina a los 3 meses, hasta el punto en el que en el grupo de norepinefrina creciente la ventaja de homocigotos para Arg es por una reducción de mortalidad relativamente mejor del 64% (p=0,08). Estos datos de cambio de norepinefrina y de nivel inicial indican que la ventaja terapéutica de bucindolol para el estado de homocigotos para Arg del β_1 AR está directamente relacionada con el grado de actividad adrenérgica y no con la protección frente a simpaticolisis.

TABLA 8

Pacientes tratados con bucindolol en el subestudio de ADN de BEST con mediciones de norepinefrina (NE) (pg/ml, n=439)

Grupo de NE	Razón de riesgo de mortalidad, Arg/Arg : portador de Gly	IC del 95%	Valor de p de Cox	N.º de acontecimientos
NE de n. inic. (n)				
64-356 (146)	0,90	0,37;2,22	0,82	19
358-545 (144)	0,74	0,37;1,51	0,41	31
546-2571 (149)	0,68	0,32;1,47	0,33	29
*Cambio de NE a los 3 meses (n)				
Grupo 1, <-244 (70)	1,07	0,41;2,78	0,89	17
Grupo 2, -244 a 145 (248)	0,82	0,43;1,59	0,56	36
Grupo 3, >145 (54)	0,36	0,11;1,15	0,08	14

n. inic.=nivel inicial. *, el cambio de NE en el grupo de bucindolol a los 3 meses se relacionó con un desenlace de supervivencia posterior; los puntos de corte son del análisis de probabilidades publicado anteriormente de la cohorte entera. En ese análisis en comparación con el grupo 2, el grupo tenía un aumento de 1,69 veces (p<0,05) de la mortalidad, y el grupo 3 un aumento de 1,65 veces (p<0,05) de la mortalidad.

Ejemplo 7

Análisis adicional del ensayo BEST

5 En la insuficiencia cardíaca crónica, la activación del sistema nervioso adrenérgico tiene dos consecuencias aparentemente antitéticas (figura 14). Por un lado, la activación adrenérgica en curso proporciona un soporte importante al corazón con insuficiencia, y la eliminación farmacológica de este soporte mediante agentes simpaticolíticos aumenta la mortalidad (Bristow *et al.*, 2004; Cohn *et al.*, 2003). Por otro lado, estimulación β -adrenérgica crónica es cardiomiopática, y el bloqueo del receptor β -adrenérgico puede mejorar el fenotipo de cardiomiopatía dilatada y los desenlaces clínicos. El desafío de la terapia anti-adrenérgica es el de no interferir sustancialmente con el soporte adrenérgico, al tiempo que se inhiben los efectos adversos. La estrategia de empezar con dosis bajas de agentes β -bloqueantes de acción de masas/competitivos, reversibles, ha sido muy satisfactoria en tratar con este delicado equilibrio, particularmente en pacientes con insuficiencia cardíaca menos avanzada.

15 Queda claro que en BEST, bucindolol encontró dificultades para equilibrar los efectos de una terapia anti-adrenérgica, retirando excesivamente el soporte en pacientes de clase IV (Anderson *et al.*, 2003). Los pacientes de clase IV tratados con bucindolol tenían un aumento estadísticamente significativo de 1,7 veces en el criterio de valoración combinado de muerte u hospitalización por insuficiencia cardíaca a lo largo de los 6 primeros meses de tratamiento, mientras que pacientes de clase III no tenían tal efecto adverso temprano y en total tenían una reducción sumamente significativa ($p=0,0001$) del 22% de la tasa de acontecimientos. El subgrupo de pacientes con la gran respuesta simpaticolítica al bucindolol estaba representado en exceso en pacientes de clase IV, como se esperaba, ya que este subgrupo tiene niveles de norepinefrina de nivel inicial muy altos (figura 15). El subgrupo de pacientes con la gran respuesta simpaticolítica al bucindolol también tenía una función de VI y VD peor, como se esperaba (figura 16).

25 Hubo un aumento de la mortalidad de 1,7 veces en BEST en el subgrupo (18% de la cohorte tratada) que experimentó simpaticolisis profunda (reducción de norepinefrina en $\geq 244,5$ pg/ml). El resultado de este subgrupo es similar al del ensayo MOXCON, en pacientes que recibieron el agente simpaticolítico “puro” moxonidina (Cohn *et al.*, 2003). Parece haber dos maneras farmacogenéticas en las que puede protegerse a los pacientes frente a este efecto adverso: 30 1) tienen la versión de tipo natural del receptor α_{2C} , que es uno de los determinantes de liberación de norepinefrina (Bristow 2000); 2) tienen la variante de alta funcionalidad del receptor β_1 que supuestamente les permite resistir la pérdida de señalización de norepinefrina. Por tanto, la selección previa para determinar la presencia o bien de α_{2C} AR de tipo natural o bien de β_1 AR-389Arg/Arg identifica poblaciones de pacientes que tienen una reducción de la mortalidad respectivamente del 29% ($p=0,031$) o del 38% ($p=0,030$).

35 En el subgrupo de sujetos negros, parece haber un perfil farmacogenómico específico presente en números sustanciales de pacientes que llevó a la ineficacia y una tendencia de desenlaces adversos con tratamiento con bucindolol. Los sujetos negros tienen una frecuencia alélica muy superior (aproximadamente 10 veces) para una variante de pérdida de funcionalidad del receptor α_{2C} , que supone una delección de los aminoácidos 322-325 en el 3^{er} bucle intracitoplasmático de la proteína receptora (Small *et al.*, 2000). Se esperaba que tal pérdida de la función en el α_{2C} AR aumentara el impulso adrenérgico, dado que la acción inhibidora adrenérgica previa a la unión normal de receptores α_{2C} está comprometida (Brum *et al.*, 2002). Los sujetos en BEST y particularmente los sujetos negros que eran heterocigotos u homocigotos (portadores de α_{2C} AR-Del322-325) para esta variante génica tenían una tendencia a una norepinefrina sistémica aumentada en el nivel inicial, y tenían una respuesta simpaticolítica al bucindolol mucho mayor (figura 17). En efecto, aproximadamente el 61% de sujetos negros en BEST eran portadores de α_{2C} AR-Del322-325, en comparación con el 8% de sujetos no negros (figura 18). En sujetos que eran portadores de α_{2C} AR-Del322-325, sólo hubo un aumento del 10% de la mortalidad en la cohorte tratada con bucindolol, en comparación con una reducción del 29% de la mortalidad ($p=0,031$) en sujetos que tenían α_{2C} AR de tipo natural (figura 19).

50 Otra forma de protegerse frente al efecto simpaticolítico de bucindolol es tener la variante 389Arg/Arg de alta funcionalidad del β_1 AR (figura 15) (Mason *et al.*, 1999), que presentaba el 47% de la población de BEST. Tal como se muestra en la figura 20 y el ejemplo 4, si un individuo es 389Arg/Arg (homocigoto para Arg) frente a un portador de 389Gly para β_1 AR es probablemente un determinante principal de la respuesta al β -agonista, incluso más que la presencia o ausencia de insuficiencia cardíaca. Se espera que individuos que son β_1 AR-389Arg/Arg serán relativamente resistentes a los efectos adversos de simpaticolisis, ya que niveles incluso inferiores de norepinefrina producirán una respuesta inotrópica relativamente robusta (figura 20). De hecho éste parece ser el caso, tal como se muestra en la figura 19. La figura 21 indica que en pacientes que son portadores α_{2C} AR-Del322-325, la presencia del receptor β_1 AR-389Arg/Arg convierte un aumento del 36% de la mortalidad en portadores de β_1 AR-389Gly en una reducción de la mortalidad del 18%.

60 Además de proteger frente a la depresión miocárdica resultante de la simpaticolisis, el genotipo β_1 AR-389Arg/Arg confiere una mayor “hiper-respuesta” al bucindolol (figuras 5-7). Esto se debe probablemente a que la variante β_1 AR-389Arg/Arg de alta funcionalidad confiere un mayor grado de cardiomiopatía. Debido a esta función superior, el grado absoluto de inhibición de la transducción de señal por el bucindolol es mucho mayor, lo que se traduce en una mayor posibilidad de beneficio en pacientes con el genotipo β_1 AR-389Arg/Arg.

Tal como se muestra en la figura 21 y la figura 20, los pacientes que tenían la variante de receptor 389Arg/Arg tenían una mayor respuesta de reducción de la mortalidad al bucindolol, en la cohorte entera (reducción de la mortalidad del 38% ($p=0,030$) frente a una reducción no significativa del 10% en portadores de Gly), y en los pacientes con α_{2C} AR de tipo natural (reducción de la mortalidad del 40% ($p=0,037$) frente a una reducción no significativa del 22% en portadores de Gly). Por lo tanto, la presencia o ausencia del genotipo β_1 AR-389Arg/Arg marcador de hiper-respuesta es el determinante principal de la respuesta al bucindolol en pacientes con insuficiencia cardíaca avanzada. La figura 22 ilustra la progresión del aumento de la eficacia para la reducción de la mortalidad en BEST usando variantes génicas para definir subpoblaciones. Para la comparación, el único otro ensayo de mortalidad por insuficiencia cardíaca de β -bloqueante que incluyó un número relativamente grande (>500) de pacientes estadounidenses, MERIT-HF, también se representa en la figura 7. Tal como se puede observar, la reducción de la mortalidad en BEST aumenta desde un 10% no significativo en la cohorte entera hasta el 29% en el 80% de los pacientes que eran α_{2C} AR de tipo natural, hasta el 38% en el 47% de los pacientes que eran β_1 AR-389Arg/Arg, hasta el 40% en el 40% de los pacientes que eran tanto α_{2C} AR de tipo natural como β_1 AR-389Arg/Arg. En comparación, la razón de riesgo para metoprolol CR/XL en pacientes estadounidenses incluidos un MERIT-HF fue de 1,05 (Wedel *et al.*, 2001).

Aunque es posible que los datos específicos de genotipo β_1 AR-389 generados a partir de BEST sean generalmente válidos para todos los β -bloqueantes, hay buenas razones para considerar que puede que los hallazgos sólo se apliquen a bucindolol. En primer lugar, tal como se trató anteriormente, el genotipo β_1 AR-389Arg/Arg evita los efectos adversos de simpaticolisis, y la simpaticolisis es única para bucindolol entre los β -bloqueantes usados para tratar la insuficiencia cardíaca. En segundo lugar, para inhibir al máximo la señalización mediante el receptor β_1 AR-389Arg/Arg de alta funcionalidad, realmente puede ser útil disminuir la norepinefrina y bloquear el receptor, una combinación de propiedades que sólo presenta el bucindolol. Finalmente, los datos de variante génica generados en el ensayo BEST con bucindolol sólo pueden considerarse válidos en insuficiencia cardíaca de clase III-IV avanzada. Es muy posible que en insuficiencia cardíaca menos avanzada (clase I-II de NYHA) el bucindolol sería el fármaco de elección en sujetos con una combinación de portador de α_{2C} AR-Del322-325 más β_1 AR-389Arg/Arg, dado que la simpaticolisis y la pérdida del soporte de la función miocárdica sería un problema menor en esta población de pacientes, y los individuos que tienen el haplotipo de α_{2C} AR-Del/Del + β_1 AR-389Arg/Arg tienen un aumento de 10 veces del riesgo de desarrollo de insuficiencia cardíaca (Small *et al.*, 2002). Bucindolol puede ser posiblemente la terapia definitiva para estos pacientes, debido a que disminuye la norepinefrina (tratando por tanto el impacto del alelo α_{2C} AR-Del322-325) y bloquea el β_1 AR.

Hay una controversia en la bibliografía en cuanto a si el bucindolol tiene actividad simpaticomimética intrínseca (ASI) en el corazón humano, una propiedad que se ha ofrecido como explicación para los resultados del ensayo BEST con bucindolol. Aunque bucindolol tiene claramente ASI en el miocardio de roedores, estudios extensos de los inventores indican que el bucindolol tiene actividad agonista inversa extremadamente baja sin ninguna ASI en el miocardio ventricular humano en funcionamiento. Tal como se muestra en Bristow *et al.*, 1998, bucindolol no aumenta la frecuencia cardíaca nocturna con monitorización de Holder, que se considera que es el indicador más sensible de ASI en el corazón humano y una prueba que puede identificar fácilmente la ASI de xamoterol o celiopropol (Xameterol Study Group, 1990; Silke *et al.*, 1997). Además, estudios extensos realizados por los inventores en preparaciones de corazón humano aislado, bucindolol no mostró ninguna evidencia de ASI en corazones humanos sin insuficiencia (figura 23 y 24) o con insuficiencia (figura 25 y 26). De hecho, en el corazón con insuficiencia, carvedilol da más señal inotrópica positiva que bucindolol, en preparaciones previamente tratadas de forskolina (requeridas para aumentar la transducción de señal para detectar ASI débil) (figura 26). En BEST, la respuesta más favorable al bucindolol en la variante β_1 AR-389Arg/Arg de alta funcionalidad es una prueba adicional contra ASI de bucindolol en el miocardio ventricular humano.

Ejemplo 8

Revisión del ensayo BEST

Un subestudio de ADN de BEST, realizado en 1040 pacientes, sometió a prueba hipótesis prospectivas con respecto a dos polimorfismos de receptor adrenérgico que, basándose en un trabajo en sistemas modelos (Mialet *et al.*, 2003) o en estudios de insuficiencia cardíaca epidemiológica (Small *et al.*, 2002), tenían el potencial de interactuar con el efecto del tratamiento de bucindolol. Se encontró que estas dos variantes génicas de receptor adrenérgico, ambas de las cuales muestran frecuencias alélicas diferenciales en poblaciones de sujetos negros frente a no negros, afectaban notablemente a los desenlaces del tratamiento en BEST. El primero fue el polimorfismo α_{2C} DEL322-325, una variante génica con pérdida de función que aumenta el impulso adrenérgico y predispone a un efecto simpaticolítico exagerado del bucindolol. Los pacientes que eran portadores de α_{2C} DEL322-325 y que se trataron con bucindolol tuvieron una reducción promedio de norepinefrina a los 3 meses de 153 ± 57 (EEM) pg/ml, en comparación con una reducción de 50 ± 13 pg/ml en pacientes con α_{2C} WT/WT tratados con bucindolol ($p=0,008$). En BEST tales respuestas simpaticolíticas exageradas se asociaron con un aumento de 1,7 veces estadísticamente significativo de la mortalidad (Bristow *et al.*, 2004). Hubo dos subgrupos clínicos o demográficos que tenían predisposición a una simpaticolisis marcada, pacientes de clase IV y sujetos negros, los dos únicos subgrupos que tenían razones de riesgo de mortalidad $>1,0$ en BEST (BEST Writing Committee, 2001). La frecuencia alélica de α_{2C} DEL322-325 era de 0,42 en sujetos negros y de 0,04 en sujetos no negros ($p<0,0001$). Tal como se muestra en la columna 3 de la tabla

9, pacientes en BEST que eran homocigotos para el tipo natural (WT/WT) para el receptor adrenérgico α_{2C} tenían una reducción del 30% de la mortalidad por todas las causas ($p=0,031$) y una reducción del 41% de la mortalidad cardiovascular ($p=0,004$), mientras que los pacientes que eran portadores del polimorfismo DEL322-325 tenían un aumento del 9% ($p=NS$) de la mortalidad por todas las causas, y un aumento del 3% de la mortalidad cardiovascular ($p=NS$). En total, el 80% del ensayo BEST, que estaba compuesto por un 24% de sujetos negros, era α_{2C} WT/WT, incluyendo el 34% de sujetos negros. Por tanto, examinando sencillamente para seleccionar la presencia del polimorfismo DEL322-325 y tratando sólo al 85% de la población estadounidense que son homocigotos para el tipo natural para el receptor adrenérgico α_{2C} eliminaría el aumento de riesgo de simpaticolisis/mortalidad del bucindolol en poblaciones con insuficiencia cardíaca avanzada, y mejoraría su perfil terapéutico. Tal como se desarrolla a continuación, los pacientes que son portadores de α_{2C} DEL322-325 pueden tratarse con bucindolol si tienen el genotipo β_1 389Arg/Arg (la prevalencia de genotipo en BEST de 0,32 en sujetos negros y de 0,51 en sujetos no negros), de modo que la población elegible para bucindolol es del 85%+6%=91% de la población estadounidense con insuficiencia cardíaca total, basándose en porcentajes de raza del 12% de sujetos negros y el 85% de sujetos no negros. Además, más del 50% de los sujetos negros (34%+21%=55%) podría tratarse con bucindolol usando selección de genotipo.

El otro polimorfismo de receptor adrenérgico que se encontró que influía sobre el efecto del tratamiento de bucindolol en BEST fue el SNP β_1 389Arg/Gly, en el que la variante de funcionalidad superior Arg/Arg confería una “hiper-respuesta” al bucindolol (tabla 9, columna 5) en comparación con la presencia del alelo Gly (“portadores de Gly” columna 6, tabla 9). La evidencia de que la variante 389Arg/Arg muestra una función de transducción de señal superior a la de variantes de portador de Gly se proporcionó en el paquete de información de la reunión del 28/3/05, y la evidencia de que el alelo 389Arg es más cardiomiopático que el 389Gly se ha publicado por el grupo del Dr. Liggett (Mialet *et al.*, 2003). Como se puede observar en la tabla 9, los pacientes en BEST que eran 389Arg/Arg tenían una reducción del 38% ($p=0,030$) de la mortalidad por todas las causas, y una reducción del 46% de la mortalidad cardiovascular ($p=0,015$) de bucindolol, en comparación con las reducciones de la mortalidad respectivas del 10% y el 22% (ambas $p=NS$) en pacientes que eran portadores de 389Gly. Dado que no hay ninguna evidencia de que el carvedilol (Small *et al.*, 2002) o metoprolol CR/XL (White *et al.*, 2003) tengan una respuesta terapéutica marcadamente diferenciada entre β_1 389Arg/Arg y portadores de β_1 389Gly, es probable que los efectos saludables del bucindolol en pacientes con la variante génica de receptor β_1 389Arg/Arg se deban a la combinación disminución de la señalización de norepinefrina y antagonismo competitivo del receptor. Con respecto a esto, el grupo del Dr. Bristow ha presentado evidencias basadas en datos fisiológicos y de marcador molecular/biomarcador de que los pacientes con insuficiencia cardíaca tratados con dosis terapéuticas completas de agentes β -bloqueantes muestran evidencias de señalización adrenérgica miocárdica en curso (Lowe *et al.*, 2001), y por tanto la disminución de norepinefrina en pacientes con la variante de receptor de alta funcionalidad β_1 389Arg/Arg puede ofrecer beneficios adicionales.

Además, los pacientes que tenían tanto β_1 389Arg/Arg como α_{2C} -WT/WT (columna 8, tabla 9) tenían una reducción del 40% de la mortalidad por todas las causas ($p=0,037$), una reducción del 47% de la mortalidad cardiovascular ($p=0,020$), y una reducción del 39% de la mortalidad + hospitalización por insuficiencia cardíaca ($p=0,002$), o respuestas terapéuticas que son muy superiores a las de la cohorte de BEST entera o en los diplotipos opuestos relacionados. Con respecto a eso, la columna 11 en la tabla 9 indica que los pacientes que tenían tanto α_{2C} DEL322-325 como eran portadores de β_1 389Gly tenían un aumento del 35% de la mortalidad por todas las causas, y un aumento del 36% de la mortalidad CV en BEST. La explicación obvia para estas respuestas adversas es que los pacientes con insuficiencia cardíaca avanzada que tienen el receptor adrenérgico β_1 portador de 389Gly de baja funcionalidad no pueden tolerar la respuesta simpaticolítica exagerada asociada con el estado de portador de α_{2C} DEL. En cambio, los pacientes con el receptor β_1 de alta funcionalidad (389Arg/Arg), que se caracteriza por respuestas robustas a bajas concentraciones de catecolaminas, no tienen tal efecto adverso sobre la mortalidad total o cardiovascular (tabla 9, columna 9). Aunque el número relativamente pequeño de pacientes y acontecimientos excluyen la significación estadística para cualquier criterio de valoración de la mortalidad en el subgrupo { α_{2C} DEL322-325 y portador de β_1 389Gly}, la congruencia de estos hallazgos tanto con datos simpaticolíticos como con la farmacología molecular de los polimorfismos de receptor adrenérgico son argumentos a favor de su importancia científica y clínica cuando el problema es la seguridad del paciente.

En BEST, la frecuencia alélica de β_1 389Arg/Arg era de 0,72 en sujetos no negros, pero sólo de 0,57 en sujetos negros ($p<0,0001$). Por tanto, en BEST los sujetos negros tenían una frecuencia superior de un alelo que predispone al aumento de la mortalidad (α_{2C} DEL322-325), y una frecuencia inferior del alelo β_1 389Arg/Arg de “hiper-respuesta”. Ambas de estas diferencias genéticas en sujetos negros americanos contribuían probablemente a la tendencia hacia un desenlace adverso en este grupo demográfico (BEST Writing Committee, 2001).

Los subestudios farmacogenómicos de BEST usaron hipótesis prospectivas basadas en la interacción farmacológica anticipada del bucindolol con polimorfismos de receptor adrenérgico específicos que se habían investigado extensamente con anterioridad en sistemas de seres humanos y modelos. Por consiguiente, se cree que estas hipótesis farmacogenómicas son más válidas que los análisis de subgrupos, derivados retrospectivamente, convencionales.

A continuación se incluyen los datos farmacogenéticos analizados del ensayo BEST. La población que accedió al subestudio de ADN y análisis farmacogenómico no era diferente de la cohorte entera en características de nivel inicial.

ES 2 345 993 T3

Además, no había ninguna evidencia de un efecto de gen-dosis para cualquier polimorfismo; los efectos sobre heterocigotos fueron los mismos o mayores que en homocigotos. Debido a esto, se supone que los alelos tanto α_{2c} DEL322-325 como β_1 389Gly actúan como negativos dominantes.

TABLA 9

Criterio de valoración	BEST cohorte entera bucindolol (n=2708) media seg. 2,0 años	BEST α_{2c} WT/WT bucindolol (n=829/1036) media seg. 2,0 años	BEST portador de α_{2c} DEL bucindolol (n=207/1036) media seg. 2,0 años	BEST β_1 389Arg/Arg bucindolol (n=493/1040) media seg. 2,0 años	BEST portador de β_1 389Gly bucindolol (n=547/1040) media seg. 2,0 años
Mortalidad	0,90; 860 Ac. (0,78; 1,02) p=0,10	0,70; 155 Ac. (0,51; 0,97) p=0,031	1,09; 37 Ac. (0,57; 2,08) p=0,79	0,62; 82 Ac. (0,40; 0,96) p=0,030	0,90; 111 Ac. (0,62; 1,30) p=0,57
Mortalidad CV	0,86; 731 Ac. (0,74; 0,99) p=0,040	0,59; 130 Ac. (0,42; 0,85) p=0,004	1,03; 32 Ac. (0,52; 2,07) p=0,92	0,54; 66 Ac. (0,33; 0,89) p=0,015	0,78; 97 Ac. (0,52; 1,18) p=0,24
Mortalidad + hospi- talización por IC	0,81; 1421 Ac. (0,73; 0,90) P<0,0001	0,72; 341 Ac. (0,59; 0,90) p=0,003	0,89; 84 Ac. (0,58; 1,37) p=0,60	0,66; 190 Ac. (0,50; 0,88) p=0,004	0,87; 236 Ac. (0,62; 1,30) p=0,25
Hospitali- zación por IC	0,78; 1045 Ac. (0,69; 0,88) P<0,001	0,74; 267 Ac. (0,58; 0,95) p=0,016	0,76; 67 Ac. (0,47; 1,24) p=0,27	0,64; 154 Ac. (0,48; 0,90) p=0,006	0,86; 181 Ac. (0,64; 1,15) p=0,30
Criterio de valoración	BEST β_1 389Arg/Arg + α_{2c} WT/WT bucindolol (n=418/1036) media seg. 2,0 años	BEST β_1 389Arg/Arg + portador de α_{2c} DEL bucindolol (n=73/1036) media seg. 2,0 años	BEST portador de β_1 389Gly + α_{2c} WT/WT bucindolol (n=411 / 1036) media seg. 2,0 años	BEST portador de β_1 389Gly + portador de DEL bucindolol (n=134/1036) media seg. 2,0 años	MERIT-HF pacientes estado- unidenses metoprolol CR/XL (n=1071 / 3991) media seg. 1,0 año

ES 2 345 993 T3

5	Mortalidad	0,60; 69 Ac. (0,38; 0,97) p=0,037	0,71; 13 Ac. (0,24; 2,11) p=0,53	0,82; 86 Ac. (0,54; 1,26) p=0,37	1,35; 24 Ac. (0,61; 3,02) p=0,46	1,05; 100 Ac. (0,71; 1,56) p=NS
10	Mortalidad CV	0,53; 56 Ac. (0,31; 0,90) p=0,020	0,58; 73 Ac. (0,17; 2,02) p=0,39	0,67; 411 Ac. (0,42; 1,07) p=0,09	1,36; 22 Ac. (0,59; 3,15) p=0,47	~0,96; 90 Ac. p=NS
15	Mortalidad + hospi- talización por IC	0,61; 156 Ac. (0,44; 0,84) p=0,002	0,85; 34 Ac. (0,43; 1,69) p=0,64	0,86; 185 Ac. (0,64; 1,16) p=0,32	0,81; 50 Ac. (0,46; 1,43) p=0,47	~0,84; 200 Ac. (0,61; 1,12) p=NS
20	Hospitali- zación por IC	0,59; 126 Ac. (0,41; 0,84) p=0,004	0,81; 73 Ac. (0,38; 1,72) p=0,59	0,93; 411 Ac. (0,67; 1,29) p=0,66	0,62; 134 Ac. (0,32; 1,21) p=0,16	ND
25						

Efectos de β -bloqueantes frente a placebo en los únicos datos disponibles/publicados de ensayos de mortalidad de intención de tratar realizados en pacientes estadounidenses con insuficiencia cardíaca
Ac. = Acontecimientos; ND, no disponible.

Ejemplo 9

Estudios adicionales: diseño I

Por motivos éticos, ya no es posible realizar ensayos controlados con placebo con β -bloqueantes en pacientes con insuficiencia cardíaca provocada por una cardiomiopatía dilatada primaria o secundaria. Esto deja como opciones de diseño estudios de no inferioridad o de superioridad frente a un control con β -bloqueante activo, o alternatively la comparación de la respuesta de bucindolol entre variantes génicas. Una opción de diseño de no inferioridad parece que se eliminaría por la falta de datos de variante génica del receptor para cualquier otro agente (entre otros ensayos de fase III sólo MERIT-HF tenía un subestudio farmacogenómico (Small *et al.*, 2002), y fue demasiado pequeño como para alcanzar cualquier conclusión significativa). Como se muestra en la figura 27, como diseño I del estudio es posible un esquema de estudio que comparará la combinación de la selección como diana del genotipo y bucindolol con una terapia no dirigida con metoprolol CR/XL, usando un criterio de valoración principal del tiempo hasta la muerte u hospitalización por insuficiencia cardíaca. En el diseño I, pacientes aleatorizados a bucindolol que son portadores de β_1 AR-389Gly no entrarán dentro del estudio, dado que basándose en datos de BEST la respuesta al bucindolol no es suficiente para justificar una evaluación adicional. Estos pacientes entrarán en vez de eso en un registro en el que se recogerá un mínimo de información, probablemente limitada al estado vital, mientras se les trata de la manera que elijan los médicos que les tratan. La comparación principal del diseño I será entre pacientes con β_1 AR-389Arg/Arg tratados con bucindolol, y todos los genotipos tratados con una terapia no dirigida con metoprolol CR/XL (TOPROL XL). El tamaño de muestra aleatorizada total para el diseño I será de 900, participando 662 sujetos en la comparación de desenlace principal.

Ejemplo 10

Estudios adicionales: diseño II

En el diseño II del estudio (figura 28) para un diseño de estudio adicional, inicialmente se examinaron pacientes con insuficiencia cardíaca sintomática y avanzada (reforzado por historia de hospitalización por insuficiencia cardíaca a lo largo del año anterior; por tanto, en el ensayo se permiten pacientes que son de clase II en el momento de la selección) y FEV1 $\leq$ 0,35 (la descripción general de la población del ensayo BEST) para seleccionar ausencia del polimorfismo α_{2C} 322-325DEL, en el estado de portador (o bien heterocigoto o bien homocigoto). Esta restricción elimina gran parte del efecto adverso de simpaticolisis del bucindolol, manifestado principalmente como una tendencia a aumentar la mortalidad en BEST (razón de riesgo 1,09; columna 4, tabla 9) y en MOXCON, y se anticipa que bucindolol tendrá una ligera ventaja en comparación con metoprolol CR/XL en los genotipos restantes que se tratan con un fondo de receptor adrenérgico de tipo natural (WT/WT) homocigoto para α_{2C} puro.

El criterio de valoración principal del ensayo es la no inferioridad frente a metoprolol CR/XL (TOPROL-XL), usando el límite de confianza superior (LCS) del 95% de la razón de riesgo del criterio de valoración de tiempo hasta la mortalidad más hospitalización por insuficiencia cardíaca que se midió en el ensayo MERIT-HF (Hjalmarson *et al.*, 2000). Aunque el ensayo MERIT-HF incluyó todos los genotipos, sólo 208 (5,2%) de los 3991 pacientes incluidos eran negros. Los portadores de α_{2c} 322-325DEL están representados sumamente en exceso en sujetos negros (en el ensayo BEST la frecuencia alélica de α_{2c} 322-325DEL fue de 0,423 en sujetos negros frente a 0,043 en sujetos no negros, mientras que la prevalencia del portador de DEL fue del 66% en sujetos negros frente al 8% en sujetos no negros). Por lo tanto probablemente el ensayo MERIT-HT tenía aproximadamente el 90% de α_{2c} de tipo natural, o era genotípicamente comparable con la población de estudio propuesta en el diseño II. Además, dado que metoprolol CR/XL no tiene efectos simpaticolíticos no existe ninguna razón para esperar una respuesta diferencial al metoprolol CR/XL en α_{2c} de tipo natural frente a portadores de DEL. El límite de confianza superior (LCS) del 95% para la razón de riesgo para bucindolol:metoprolol CR/XL ("margen de no inferioridad") se ha determinado a partir de la fórmula (Hasselblad *et al.*, 2001) $\{(LCS \text{ de bucindolol:metoprolol CR/XL}) \cdot (LCS \text{ de metoprolol CR/XL:placebo}) \leq 1,0\}$; usando el LCS de la cohorte entera de MERIT-HF de 0,80 para metoprolol:placebo produce $x \cdot 0,80 \leq 1,0$ o un margen de no inferioridad de $x \leq 1,25$. El valor de 1,25 se redujo entonces hasta 1,16 para proporcionar una mayor certeza sobre la no inferioridad. El LCS objetivo de 1,16 también es el valor obtenido cuando se amplía a escala la razón de riesgo/LCS de MERIT-HF desde los valores observados de 0,69/0,80 hasta una razón de riesgo de 1,0. Entonces se determinó la estimación de la potencia del 85% para una α bilateral $\leq 0,05$ a partir de una razón de riesgo esperada de 0,90 (la ligera ventaja de bucindolol en una población con α_{2c} WT/WT, conseguida mediante una mejor inhibición de bucindolol de β_1 -389Arg/Arg y/o su bloqueo del receptor β_2 miocárdico).

El soporte para una ventaja de bucindolol sobre metoprolol CR/XL se proporciona por los pacientes estadounidenses incluidos en MERIT-HT (tabla 9), que cuando se trataron con metoprolol CR/XL tenían un aumento de la mortalidad del 5% y una disminución de la mortalidad + hospitalización por IC del 16%. En cambio, en BEST la cohorte entera tenía una reducción de la mortalidad del 10% ($p=0,10$) y una disminución de la mortalidad + hospitalización por IC del 19% ($p<0,0001$), mientras que los pacientes con α_{2c} de tipo natural tenían una reducción de la mortalidad del 30% ($p=0,031$), y una reducción de la mortalidad más hospitalización por IC del 28% ($p=0,003$). La división de las razones de riesgo (0,72/0,84) proporciona una razón de riesgo esperada de 0,86, y un tamaño de efecto para bucindolol frente a metoprolol CR/XL de 1,00-0,86, ó 0,14. Por tanto, no es irrazonable esperar una diferencia del 10% a favor de bucindolol frente a metoprolol CR/XL en una población estadounidense que es α_{2c} WT/WT. Mediante el criterio propuesto en la figura 28, independientemente de la razón de riesgo de bucindolol/metoprolol, si el LCS es $<1,16$, la conclusión sería que bucindolol no es inferior a metoprolol CR/XL para los efectos sobre el tiempo hasta la mortalidad u hospitalización por IC, en una población con IC avanzada que es al 100% homocigota para receptor adrenérgico α_{2c} de tipo natural.

Se pretende que la segunda parte del diseño del ensayo proporcione evidencias adicionales de que bucindolol dirigido farmacogenómicamente es superior a metoprolol CR/XL no dirigido, como criterio de valoración secundario. Aquí la población tratada con bucindolol son pacientes con β_1 -389Arg/Arg que también son α_{2c} de tipo natural. En BEST el 47% de la cohorte entera era β_1 -389Arg/Arg, como lo eran el 50% de los pacientes con α_{2c} de tipo natural. Como se muestra en la tabla 9, el diplotipo de β_1 -389Arg/Arg + α_{2c} de tipo natural mostró una reducción de la mortalidad del 40% ($p=0,037$), una reducción de la mortalidad + hospitalización por IC del 39% ($p=0,002$), y una reducción de la hospitalización por IC del 41% ($p=0,004$). La razón de riesgo esperada para mortalidad + hospitalización por IC para bucindolol:metoprolol CR/XL (datos estadounidenses de MERIT) sería de 0,61/0,84, ó 0,73. El uso de un tamaño de efecto del 27% en pacientes con diplotipo β_1 -389Arg/Arg + α_{2c} de tipo natural tratados con bucindolol frente a metoprolol CR/XL proporciona un cálculo de la potencia del 81%. Por tanto en el ensayo propuesto mostrado en la figura 28, el margen de no inferioridad para el criterio de valoración principal se basa de manera conservadora en los resultados de la cohorte entera de MERIT-HF, mientras que los cálculos de la potencia para los criterios de valoración tanto principal como secundario incorporan una ventaja esperada de bucindolol en los genotipos seleccionados, basándose en datos reales en poblaciones estadounidenses tanto para bucindolol como para metoprolol CR/XL. El respaldo para la validez de esta comparación es que en el subestudio de ADN del ensayo BEST, pacientes con β_1 -389 Arg/Arg tratados con placebo tenían tasas de acontecimientos idénticas a pacientes portadores de β_1 -389Gly tratados con placebo (figuras 6 y 7). En otras palabras, como se muestra en la figura 7, la tasa de acontecimientos más favorable en pacientes con β_1 -389 Arg/Arg tratados con bucindolol se debe totalmente al efecto del tratamiento, no a una mejor historia natural de pacientes con el genotipo β_1 -389 Arg/Arg. Este criterio de valoración secundario de 1^{er} orden proporcionará a los médicos evidencias adicionales de que la selección como diana del genotipo con bucindolol produce mejores resultados clínicos que la terapia no dirigida con un β -bloqueante aprobado para insuficiencia cardíaca.

En el diseño del ensayo mostrado en la figura 28, la población tratada con bucindolol son pacientes con β_1 -389Arg/Arg que también son α_{2c} de tipo natural. En BEST el 47% de la cohorte entera era β_1 -389Arg/Arg, como lo era el 50% de los pacientes con α_{2c} de tipo natural. Como se muestra en la tabla 9, el dipolotipo de β_1 -389Arg/Arg + α_{2c} de tipo natural mostró una reducción del 40% de la mortalidad ($p=0,037$), una reducción del 39% de la mortalidad más hospitalización por IC ($p=0,002$), y una reducción del 41% de la hospitalización por IC ($p=0,004$). La razón de riesgo esperada para mortalidad más hospitalización por IC para bucindolol:metoprolol CR/XL (datos estadounidenses de MERIT-HF) sería de 0,61/0,84, ó 0,73. El uso de un tamaño de efecto del 27% en pacientes con diplotipo β_1 -389Arg/Arg más α_{2c} de tipo natural tratados con bucindolol frente a metoprolol CR/XL proporciona un cálculo de la potencia del 81%. Por tanto en el ensayo propuesto mostrado en la figura 28, el margen de no inferioridad para el criterio de valoración principal se basa de manera conservadora en los resultados de la cohorte entera de MERIT-

HF, mientras que los cálculos de la potencia para los criterios de valoración tanto principal como secundario incorporan una ventaja esperada de bucindolol en los genotipos seleccionados, basándose en datos reales en poblaciones estadounidenses tanto para bucindolol como para metoprolol CR/XL.

5 Ejemplo 11

Estudios adicionales: diseño III

10 En el caso de que el margen de no inferioridad de 1,16, que proporciona una conservación del 36% del efecto del tratamiento de metoprolol CR/XL con respecto a placebo, se considere insuficiente para demostrar la eficacia, se propone otro diseño. Se consideró que un LCS de 1,14, que conservará el 50% del efecto de tratamiento de metoprolol CR/XL frente a placebo a una potencia del 90%, era aceptable. Por tanto, el diseño mostrado en la figura 28 se ha ajustado para alcanzar este objetivo, con una potencia del 90% (figura 29). El aumento de la potencia estadística requerida
15 para reducir el LCS se ha logrado mediante el aumento del tamaño de muestra desde 1300 hasta 1600, y en menor grado pasando de una aleatorización 2:1 a 1:1 entre bucindolol y metoprolol CR/XL. Además, en respuesta a la reacción de la agencia se ha agregado otro criterio de valoración secundario, bucindolol frente a metoprolol CR/XL en pacientes con β_1 -389Arg/Arg. La estimación de la potencia para este criterio de valoración secundario, basándose en un tamaño de efecto esperado del 25%, es del 71%, mientras que la estimación de la potencia para el otro criterio de valoración secundario, basándose en un tamaño de efecto esperado del 27%, es del 88%. El primer tamaño de efecto del 25% fue
20 difícil de estimar debido a los datos limitados con metoprolol CR/XL en un población con β_1 -389Arg/Arg; los únicos datos disponibles sugieren poca o ninguna mejora del efecto del tratamiento con metoprolol CR/XL en comparación con placebo (White *et al.*, 2003). El tamaño de efecto del 27% para el otro criterio de valoración secundario se basa en datos estadounidenses de MERIT-HF tal como se trató anteriormente.

25 La descripción anterior se considera sólo ilustrativa de los principios de la invención. Además, dado que a los expertos en la técnica se les ocurrirán fácilmente numerosas modificaciones y cambios, no se desea limitar la invención a la construcción y los procesos exactos descritos anteriormente. Por consiguiente, puede considerarse que todas las modificaciones y equivalentes adecuados se encuentran dentro del alcance de la invención tal como se define en las siguientes reivindicaciones. Se pretende que las palabras “comprender”, “que comprende”, “incluir”, “que incluye” e
30 “incluye” cuando se usan en esta memoria descriptiva y en las siguientes reivindicaciones especifiquen la presencia de características, partes, componentes o etapas mencionados, pero no excluyen la presencia o adición de una u más de otras características, partes, componentes, etapas, o grupos de los mismos.

35 Bibliografía

- Patente estadounidense 3.817.837
- 40 Patente estadounidense 3.850.752
- Patente estadounidense 3.939.350
- Patente estadounidense 3.996.345
- 45 Patente estadounidense 4.196.265
- Patente estadounidense 4.275.149
- 50 Patente estadounidense 4.277.437
- Patente estadounidense 4.366.241
- Patente estadounidense 4.582.788
- 55 Patente estadounidense 4.627.429
- Patente estadounidense 4.659.774
- 60 Patente estadounidense 4.683.194
- Patente estadounidense 4.683.195
- Patente estadounidense 4.683.202
- 65 Patente estadounidense 4.683.202
- Patente estadounidense 4.683.202

ES 2 345 993 T3

Patente estadounidense 4.784.857
Patente estadounidense 4.800.159
5 Patente estadounidense 4.816.571
Patente estadounidense 4.883.750
Patente estadounidense 4.946.773
10 Patente estadounidense 4.959.463
Patente estadounidense 4.965.188
15 Patente estadounidense 5.126.145
Patente estadounidense 5.130.238
Patente estadounidense 5.141.813
20 Patente estadounidense 5.169.766
Patente estadounidense 5.264.566
25 Patente estadounidense 5.279.721
Patente estadounidense 5.428.148
Patente estadounidense 5.554.744
30 Patente estadounidense 5.574.146
Patente estadounidense 5.602.244
35 Patente estadounidense 5.605.798
Patente estadounidense 5.645.897
Patente estadounidense 5.662.925
40 Patente estadounidense 5.705.629
Patente estadounidense 5.788.983
45 Patente estadounidense 5.840.873
Patente estadounidense 5.843.640
Patente estadounidense 5.843.650
50 Patente estadounidense 5.843.651
Patente estadounidense 5.843.663
55 Patente estadounidense 5.846.708
Patente estadounidense 5.846.709
Patente estadounidense 5.846.717
60 Patente estadounidense 5.846.726
Patente estadounidense 5.846.729
65 Patente estadounidense 5.846.783
Patente estadounidense 5.849.481

ES 2 345 993 T3

	Patente estadounidense 5.849.483
	Patente estadounidense 5.849.486
5	Patente estadounidense 5.849.487
	Patente estadounidense 5.849.497
10	Patente estadounidense 5.849.546
	Patente estadounidense 5.849.547
	Patente estadounidense 5.851.770
15	Patente estadounidense 5.851.772
	Patente estadounidense 5.853.990
20	Patente estadounidense 5.853.992
	Patente estadounidense 5.853.993
	Patente estadounidense 5.856.092
25	Patente estadounidense 5.858.652
	Patente estadounidense 5.861.244
30	Patente estadounidense 5.863.732
	Patente estadounidense 5.863.753
	Patente estadounidense 5.866.331
35	Patente estadounidense 5.866.337
	Patente estadounidense 5.866.366
40	Patente estadounidense 5.900.481
	Patente estadounidense 5.905.024
	Patente estadounidense 5.910.407
45	Patente estadounidense 5.912.124
	Patente estadounidense 5.912.145
	Patente estadounidense 5.912.148
50	Patente estadounidense 5.916.776
	Patente estadounidense 5.916.779
55	Patente estadounidense 5.919.626
	Patente estadounidense 5.919.630
60	Patente estadounidense 5.922.574
	Patente estadounidense 5.925.517
	Patente estadounidense 5.925.525
65	Patente estadounidense 5.928.862
	Patente estadounidense 5.928.869

ES 2 345 993 T3

Patente estadounidense 5.928.870

Patente estadounidense 5.928.905

5 Patente estadounidense 5.928.906

Patente estadounidense 5.929.227

10 Patente estadounidense 5.932.413

Patente estadounidense 5.932.451

Patente estadounidense 5.935.791

15 Patente estadounidense 5.935.825

Patente estadounidense 5.939.291

20 Patente estadounidense 5.942.391

Patente estadounidense 5.952.174

Patente estadounidense 6.113.940

25 Patente estadounidense 4.656.127

Patente estadounidense 4.682.195

30 **Abbondanzo et al.**, *Breast Cancer Res. Treat.*, 16:182(151), 1990.

Allred et al., *Arch. Surg.*, 125(1):107-113, 1990.

Anand et al., *Circulation*, 107(9):1278-1283, 2003.

35 **Anderson et al.**, *J. Card. Fail.*, 9:266-277, 2003.

Asano et al., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 37:678-691, 2001.

40 **Ausubel et al.**, In: *Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, New York, 1989.

Barany, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:189-193, 1991.

Bellus, J. *Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.*, A31(1): 1355-1376, 1994.

45 **Benedict et al.**, *Circulation*, 94(4):690-697, 1996.

BEST Trial Investigators, *N. Engl. J. Med.*, 344(22):1659-1667, 2001.

50 **Bolger, Int J Cardiol**, 92(1):1-8, 2003.

Bouzamondo et al., *Fund. Clin. Pharmacol.*, 15:95-109, 2001.

Bristow et al, *Circ. Res.*, 59(3):297-309, 1986.

55 **Bristow, et al.**, *Cardiovasc/Drugs Ther.* 11:291-296, 1997.

Bristow et al., *Circulation*, 110:1437-1442, 2004.

60 **Bristow et al.**, *Circulation*, 89(4):1632-1642, 1994.

Bristow et al., *Clin. Cardiol.*, 21(12 Suppl 1):I3-13, 1998.

Bristow et al., *J Card Fail.*, 9(6):444-53, 2003.

65 **Bristow et al.**, *Mol. Pharmacol.*, 35:296-303, 1988.

Bristow, Circulation, 101:558-569, 2000.

Brodde et al., *J. Cardiovasc., Pharmacol.*, 8:1235-1242, 1986.

Brodde et al., *Z. Kardiol.*, 81:71-78, 1992.

5 **Brown et al.**, *Immunol Ser*, 53:69-82, 1990.

Brum et al. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 283:H1838-18345, 2002.

10 **Capaldi et al.**, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 74(2):425-433, 1977.

CIBIS-II Investigators, *Lancet*, 353:9-13, 1999.

Cohn et al., *Eur. J. Heart Fail.*, 5:659-667, 2003.

15 **Cohn et al.**, *N. Engl J. Med.*, 311:819-823, 1984.

De Arruda et al., *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2(5):487-496, 2002.

20 De Jager et al., *Semin. Nucl. Med.*, 23(2):165-179, 1993.

Dohlman et al., *Annu. Rev. Biochem.*, 60:653-688, 1991.

Domanski et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, 42:914-922, 2003.

25 **Doolittle et al.**, *Methods Mol Biol.*, 109:215-237, 1999.

Eichhorn et al., *Am. J. Cardiol.*, 79:794-798, 1997.

30 **Epstein et al.**, *Ann. Inn. Med.*, 65:20-7, 1968.

Solicitud europea 201.184

Solicitud europea 237.362

35 Solicitud europea 258.017

Solicitud europea 266.032

40 Solicitud europea 320 308

Solicitud europea 329.822

Solicitud europea 50.424

45 Solicitud europea 84.796

Fowler and Bristow, *Am. J. Cardiol.*, 55(10)D120-D124, 1985.

Francis et al *Circulation*, 87(6 Suppl). VI40-8, 1953.

50 Solicitud francesa 2.650.840

Frielle et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:7920-7924, 1987.

55 **Froehler et al.**, *Nucleic Acids Res.*, 14(13):5399-5407, 1986.

Frohman, In: PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications, *Academic Press, N.Y.*, 1990.

Gaffney et al., *Circ Res.*, 12:264-268, 1963.

60 **Gilbert et al.**, *Amer. J. Med.*, 88:223-229, 1990.

Granger et al., *Lancet.*, 362:772-776, 2003.

65 Solicitud británica 2.202.328

Green et al., 1994.

Gulbis and Galand, *Hum. Pathol.*, 24(12):1271-1285, 1993.

Halushka et al., *Nat. Genet.*, 22(3):239-247, 1999.

Harlow and Lane, In: *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

Hasselblad et al., *Drug Information J.*, 35:435-449, 2001.

Hein et al., *Nature*, 402:181-184, 1999.

Hershberger et al., *J. Cardiovasc. Pharm.*, 15:959-967, 1990.

Hjalmarson et al., *J. Am. Med. Assoc.*, 283:1295-1302, 2000.

Humphries, et al., In: *Molecular Diagnosis of Genetic Diseases*, Elles (Ed.), 321-340, 1996.

Innis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(24):9436-9440, 1988.

Isnard et al., *Am. J. Cardiol.*, 86(4):417-421, 2000.

Johnson et al., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 73:366-71, 2003.

Johnson et al., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 74(1):44-52, 2003.

Jones, *Nature*, 199:280-282, 1963.

Joseph et al., *Br. J. Pharm.* 142:51-56, 2004.

Kalbfleisch et al., 1980.

Kaplan et al., *J Amer. Statistical Assoc.*, 53:457-481, 1958.

Kaye et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, 26(5):1257-1263 1995.

Kc and Caldest *Bioinformatics*, 19 (2): 287-288, 2003.

Klaassen, In: *The Pharmacological Basis of Therapeutic*, Goodman and Gilman, Eds., Pergamon Press, 8th Ed., pp. 49-61, 1990.

Krum et al. *Circulation*, 92:1499-1506, 1995.

Kuppuswamy, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:1143-1147, 1991.

Kwoh et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:1173, 1989.

Kwok and Chen, *Curr Issues Mol. Biol.*, Apr; 5(2):43 -60, 2003.

Kwok et al., *Genomics*, 23(1):138-144, 1994.

Kwok, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 2:235-258, 2001.

Landegren, et al., *Science* 241:1077-1080, 1988.

Landegren, et al., *Science*, 241:1077-1080, 1988.

Levin et al., *J Biol Chem.*, 277(34):30429-30435, 2002.

Liggett et al., In: *Catecholamines*, Bouloux (Ed.), W. B. Saunders, London, 1993.

Liggett, *J. Clin. Invest.*, 107:947-948, 2001.

Liu et al., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 74:372-9, 2003.

Lohse, *Trends Mol. Med.*, 10:55-58, 2004.

Lowes et al., *Circulation*, 102:II-628, 2000.

Lowes et al., *Circulation*, 104:II-436, 2001.

Lowes et al., *N. Engl. J. Med.*, 346:1357-1365, 2002.

Mann et al., *Circulation*, 111(21):2837-2849, 2005.

5 **Mason et al.**, *J. Biol. Chem.*, 274:12670-12674, 1999.

Maxam, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:560, 1977.

10 **McMurray et al.**, *Lancet.*, 362:767-771, 2003.

MERIT-HF Study Group, *Lancet.*, 353:2001-2007, 1999.

Meyers, et al., *Science*, 230:1242, 1985.

15 **Mialet et al.**, *Nat. Med.*, 9:1300-1305, 2003.

Modrich, *Ann. Rev. Genet.*, 25:229-253, 1991.

20 **Mullis et al.**, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263-273, 1986.

Nakamura et al., In: Handbook of Experimental Immunology (4th Ed.), Weir et al., (eds). 1:27, *Blackwell Scientific Publ., Oxford*, 1987.

25 **Neumister et al.**, *Pharmacogenet.. Genomics*, 15:143-149, 2005.

Mickerson et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:8923-8927, 1990.

Nyren et al., *Anal. Biochem.* 208:171-175, 1993.

30 **O'Shaughnessy et al.**, *Clin. Sci.*, 99:233-238, 2000.

Ohara et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:5673-5677, 1989.

35 **Orita et al.**, *Genomics*, 5:874-879, 1989.

Packer et al., *Circulation*, 106(17):2194-2199, 2002.

Packer et al., *N. Engl. J. Med.*, 344:1651-1658, 2001.

40 Solicitud PCT PCT/US87/00880

Solicitud PCT PCT/US89/01025

45 Solicitud PCT WO 88/10315

Solicitud PCT WO 89/06700

Solicitud PCT WO 93/22456

50 Solicitud PCT WO 95/11995

Solicitud PCT WO89/06700

Solicitud PCT WO90/01069

55 Solicitud PCT WO91/02087

Solicitud PCT WO92/15712

60 **Perez et al.**, *Nature Med.*, 9:1300-1305, 2003.

"Physicians Desk Reference"

65 **Pollock et al.**, *Am. J. Cardiol.*, 66:603-607, 1990.

Port et al., *Mol. Pharmacol.*, 60(4):629-631, 2001.

Prezant et al., *Hum. Mutat.*, 1:159-164, 1992.

ES 2 345 993 T3

Rathz et al., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 39:155-160, 2002.

“Remington’s Pharmaceutical Sciences” 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580

Rockman et al., *Am. J. Cardiol.*, 64(19):1344-1348, 1989.

Ruano et al., *Nucl. Acids Res.*, 19:6877-6882, 1991.

Ruano et al., *Nucl. Acids Res.*, 17:8392, 1989.

Sallach et al., *Ann. Med.*, 35:259-266, 2003.

Salomon, *Methods Enzymol.*, 195:22-28, 1991.

Sambrook et al., In: Molecular cloning, *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*, 2001.

Sanger et al., *J. Molec. Biol.*, 94:441, 1975.

SAS (r) proprietary software, release 6.12. Cary, NC: *SAS Institute*, 1996.

Sederberg et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 35(2) 207A:147, 2000.

Sheffield, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:232-236, 1989.

Silke et al., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 30(6):817-823, 1997.

Small et al. *J. Biol. Chem.*, 275:23059-23064, 2000.

Small et al., *N. Engl. J. Med.*, 347:1135-1142, 2002.

Sofowora et al., *Clin Pharmacol Ther.*, 73:366-71, 2003.

Sokolov, *Nucl. Acids Res.* 18:3671, 1990.

Stephen, *Am. J. Cardiol.*, 18:463-472, 1966.

Stevens et al., *Biotechniques*, 34:198-203, 2003.

Strosberg, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 37:421-450, 1997.

Swedberg et al., *Circulation*, 105(15):1797-803, 2002.

Swedberg et al., *Circulation*, 82(5):1730-1736, 1990.

Swedberg et al., *Eur. Heart J.*, 17(9):1306-1311, 1996.

Taillon-Miller et al., *Genome Res*, 8(7):748-754, 1998.

Taylor et al., *Cong. Heart Failure*, 10:281-288, 2004.

The Merck Index, *Eleventh Edition Trial Investigators*, 2001.

Turki, et al., *J. Clin. Invest.*, 95:1635-1641, 1995.

Ugozzoll et al., *GATA* 9:107-112, 1992.

van **Campen et al.**, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 32 Suppl 1:S31-S35, 1998.

Waagstein et al., *Lancet.*, 342:1441-1446, 1993.

Wagoner et al., *Am. Heart J.*, 144(5):840-846, 2002.

Walker, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:392-396, 1992.

Wartell, et al., *Nucl. Acids Res.*, 18:2699-2706, 1990.

Wedel et al., *Am. Heart J.*, 142:502-511, 2001.

ES 2 345 993 T3

White et al., *Eur. J. Heart Fail.*, 5:463-468, 2003.

Winter, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:7575, 1985.

5 *Xameterol Study Group*, 1990.

Yancy et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, 29:284A, 1997.

10 **Yancy et al.**, *N. Engl. J. Med.*, 344(18), 1358-1365, 2001.

Yang-Feng et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:1516-1520, 1990.

Zhu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(4):1607-12, 2001.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método para evaluar el tratamiento con bucindolol para un paciente que comprende:

obtener información de secuencia referente a al menos un polimorfismo en un gen de receptor adrenérgico del paciente, en el que

(a) dicha información de secuencia comprende o bien

(i) la secuencia en la posición de nucleótido 1165 en la secuencia codificante en uno o ambos de los alelos de β_1 AR del paciente, o bien

(ii) el aminoácido en la posición 389 de las proteínas de β_1 AR del paciente; y/o

(b) en el que dicha información de secuencia comprende si

(i) la secuencia de nucleótidos en las posiciones 964-975 se ha delecionado en uno o ambos de los alelos de α_{2c} AR del paciente, o si

(ii) la secuencia de aminoácidos en las posiciones 322-325 se ha delecionado en las proteínas de α_{2c} AR del paciente,

en el que es probable que el paciente presente una respuesta positiva a bucindolol si el paciente es homocigoto para Arg389 en el gen β_1 AR o si el paciente es homocigoto de tipo natural en el gen α_{2c} AR.

2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho gen de receptor adrenérgico es β_1 AR o α_{2c} AR.

3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que se conoce el genotipo del paciente en la posición de nucleótido 1165 en las secuencias codificantes de uno o ambos alelos de β_1 AR.

4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que se conoce dicho aminoácido en la posición 389 en las proteínas de β_1 AR del paciente.

5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se conoce que dicho paciente tiene una delección en la secuencia de nucleótidos en las posiciones 964-975 en uno o ambos de los alelos de α_{2c} AR del paciente.

6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se conoce que dicho paciente tiene una delección en las posiciones 322-325 de las proteínas de α_{2c} AR.

7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además obtener una muestra biológica del paciente.

8. Método según la reivindicación 7, en el que dicha muestra biológica es una muestra de sangre.

9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además obtener una historia del paciente referente a (i) o (ii), en el que (i) es la secuencia en la posición de nucleótido 1165 en la secuencia codificante en uno o ambos alelos de β_1 AR del paciente y (ii) es el aminoácido en la posición 389 de las proteínas de β_1 AR del paciente; o en el que (i) es si la secuencia de nucleótidos en las posiciones 964-975 se ha delecionado en uno o ambos de los alelos de α_{2c} AR del paciente y (ii) es si la secuencia de aminoácidos en las posiciones 322-325 se ha delecionado en las proteínas de α_{2c} AR del paciente.

10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que conocer o bien (i) o bien (ii) implica determinar (i) o (ii), en el que (i) es la secuencia en la posición de nucleótido 1165 en la secuencia codificante en uno o ambos de los alelos de β_1 AR del paciente y (ii) es el aminoácido en la posición 389 de las proteínas de β_1 AR del paciente; o en el que (i) es si la secuencia de nucleótidos en las posiciones 964-975 se ha delecionado en uno o ambos de los alelos de α_{2c} AR del paciente y (ii) es si la secuencia de aminoácidos en las posiciones 322-325 se ha delecionado en las proteínas de α_{2c} AR del paciente.

11. Método según la reivindicación 10, en el que o bien

(a) se determina la secuencia en la posición de nucleótido 1165 en las secuencias codificantes de uno o ambos de los alelos de β_1 AR del paciente; o bien

(b) se determina la secuencia de nucleótidos en las secuencias codificantes de uno o ambos de los alelos de α_{2c} AR del paciente que va a delecionarse.

12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la determinación de la secuencia comprende secuenciación por terminación de cadena, digestión por restricción, reacción de polimerasa específica de alelo, análisis de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla, análisis de fragmentos genéticos, electroforesis en gel en gradiente de temperatura, o reacción en cadena de la ligasa.
13. Método según la reivindicación 11 (a), en el que se determina que dicho paciente tiene una citosina en la posición 1165 en las secuencias codificantes de uno o ambos alelos de β_1 AR.
14. Método según la reivindicación 13, en el que se determina que dicho paciente tiene una citosina en la posición 1165 en la secuencia codificante de un alelo de β_1 AR y una guanina en la posición 1165 en la secuencia codificante del otro alelo de β_1 AR.
15. Método según la reivindicación 11 (b), en el que se determina que dicho paciente tiene una delección de los nucleótidos 964-975 en las secuencias codificantes de uno o ambos alelos de α_{2c} AR.
16. Método según la reivindicación 15, en el que se determina que dicho paciente tiene una delección de los nucleótidos 964-975 en las secuencias codificantes de un alelo de α_{2c} AR y no tiene delección de los nucleótidos 964-975 en las secuencias codificantes del otro alelo de α_{2c} AR.
17. Método según la reivindicación 10, en el que o bien
- (a) se determina dicho aminoácido en la posición 389 de las proteínas de β_1 AR del paciente; o bien
 - (b) se determina la delección de los aminoácidos 322-325 en las proteínas de α_{2c} AR.
18. Método según la reivindicación 17, en el que la determinación del aminoácido comprende usar un anticuerpo, cromatografía de líquidos de alta resolución o espectroscopia de masas.
19. Método según la reivindicación 17 (a), en el que se determina que dicho paciente tiene
- (I) arginina en la posición 389 en las proteínas de β_1 AR;
 - (II) glicina en la posición 389 en las proteínas de β_1 AR; o
 - (III) arginina en la posición 389 en algunas proteínas de β_1 AR y una glicina en otras proteínas de β_1 AR.
20. Método según la reivindicación 17 (b), en el que se determina que dicho paciente
- (I) tiene una delección de los aminoácidos 322-325 en proteínas de α_{2c} AR;
 - (II) no tiene una delección de los aminoácidos 322-325 en cualquier proteína de α_{2c} AR; o
 - (III) tiene tanto proteínas de α_{2c} AR con una delección de los aminoácidos 322-325 como proteínas de α_{2c} AR sin una delección de los aminoácidos 322-325.
21. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 20, que comprende además preparar un informe que contiene los resultados de la determinación de (i) o (ii), en el que (i) es la secuencia en la posición de nucleótido 1165 en la secuencia codificante en uno o ambos alelos de β_1 AR del paciente y (ii) es el aminoácido en la posición 389 de las proteínas de β_1 AR del paciente; o en el que (i) es si la secuencia de nucleótidos en las posiciones 964-975 se ha delecionado en uno o ambos alelos de α_{2c} AR del paciente y (ii) es si la secuencia de aminoácidos en las posiciones 322-325 se ha delecionado en las proteínas de α_{2c} AR del paciente.
22. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en el que dicho paciente tiene síntomas de o se le ha diagnosticado un estado médico que comprende insuficiencia cardíaca, cardiomiopatía dilatada, cardiopatía isquémica, feocromocitoma, migrañas, arritmias cardíacas, hipertensión o un trastorno de ansiedad.
23. Método según la reivindicación 22, en el que dicha cardiopatía isquémica es angina y/o un infarto de miocardio.
24. Método según la reivindicación 22, en el que dicha insuficiencia cardíaca es insuficiencia cardíaca avanzada.
25. Método según la reivindicación 24, en el que dicha insuficiencia cardíaca avanzada es insuficiencia cardíaca de clase III o IV según la NYHA.

ES 2 345 993 T3

26. Método según la reivindicación 1(a), que comprende además saber si hay una delección en

- (iii) la secuencia de nucleótidos en las posiciones 964-975 en la secuencia codificante de uno o ambos de los alelos de α_{2c} AR del paciente; o
- (iv) la secuencia de aminoácidos en las posiciones 322-325 de las proteínas de α_{2c} AR del paciente.

27. Método según la reivindicación 1(b), que comprende además conocer o bien

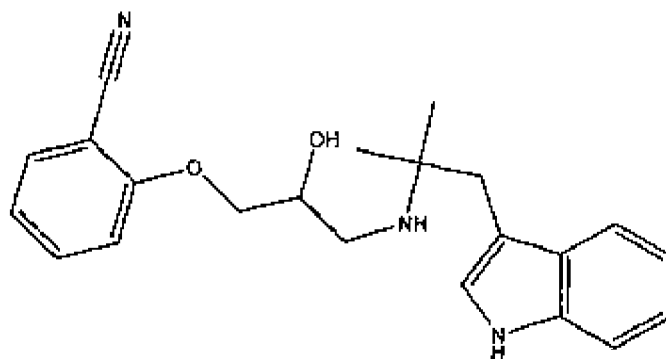
- (iii) la secuencia en la posición de nucleótido 1165 en la secuencia codificante en uno o ambos de los alelos de β_1 AR del paciente; o bien
- (iv) el aminoácido en la posición 389 de las proteínas de β_1 AR del paciente, en el que el individuo está considerándose para el tratamiento con bucindolol.

28. Uso de bucindolol para la fabricación de un medicamento para tratar un paciente con una enfermedad cardiovascular, en el que dicho paciente

- (a) no tiene niveles detectables de una proteína de β_1 AR con una glicina en la posición 389;
- (b) es homocigoto para una citosina en la posición 1165 en la secuencia codificante de nucleótidos de ambos alelos de β_1 AR;
- (c) no tiene niveles detectables de una proteína de α_{2c} AR con una delección de las posiciones 322-325; o
- (d) es homocigoto de tipo natural en las posiciones 964-975 en la secuencia codificante de nucleótidos de ambos alelos de α_{2c} AR.

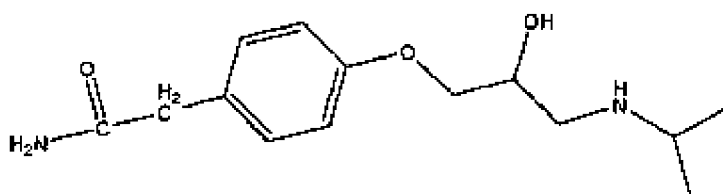
29. Bucindolol para tratar un paciente con una enfermedad cardiovascular, en el que dicho paciente

- (a) no tiene niveles detectables de una proteína de β_1 AR con una glicina en la posición 389;
- (b) es homocigoto para una citosina en la posición 1165 en la secuencia codificante de nucleótidos de ambos alelos de β_1 AR;
- (c) no tiene niveles detectables de una proteína de α_{2c} AR con una delección de las posiciones 322-325; o
- (d) es homocigoto de tipo natural en las posiciones 964-975 en la secuencia codificante de nucleótidos de ambos alelos de α_{2c} AR.



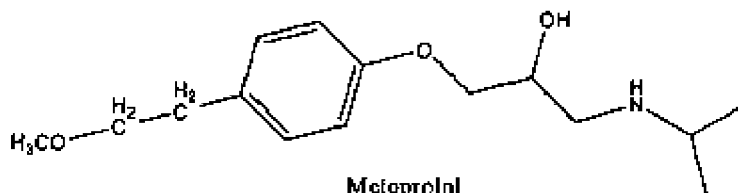
Bucindolol

2-(3-(1-(1H-indol-3-yl)-2-metilpropanil-2-amino)-2-hidroxi-propoxil)benzonitrilo



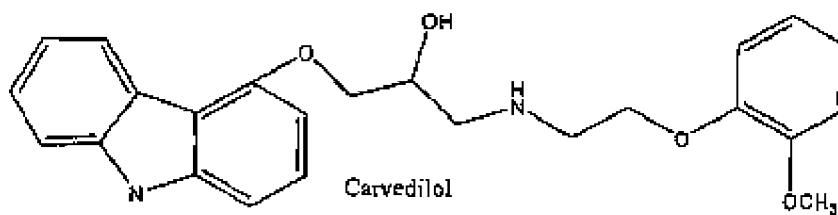
Atenolol

2-(4-(2-hidroxi-3-(isopropilamino)propoxi)fenil)acetamida



Metoprolol

1-(isopropilamino)-3-(4-(2-metoxietil)fenoxi)propan-2-ol



Carvedilol

[1-(carbazolil-(4)-oxil-3-[(2-metoxifenoxietil)amino]-2-propanol]

FIG. 1

**Agentes anti-adrenérgicos/tratamientos con datos de pruebas
de insuficiencia cardiaca de fase II o III, o en desarrollo**

Compuesto, (dispositivo)	Propiedades farmacológicas (0-4+)						
	Bloqueo de β_1 -AR	Bloqueo de β_2 -AR	Bloqueo de α_1 -AR	ASI, ser humano	GNMB*	Agonismo inverso	Simpati- colisis
Metoprolol	+++	++	0	0	0	+++	0
Bisoprolol	+++	++	0	0	0	+++	0
Carvedilol	+++	+++	+++	0	+	+	+
Bucindolol	+++	+++	+	0	+	0-+	+++
Nebivolol	+++	+	0	0	0	?	?
Moxonidina	0	0	0	0	0	0	+++
Clonidina	0	0	0	0	0	0	+++
(Estimulación del seno carotídeo)	0	0	0	0	0	0	+++

*, unión a agonista o nucleótido de guanina modulable,
la capacidad para reconocer β -AR preacoplados a αG_s

FIG. 2

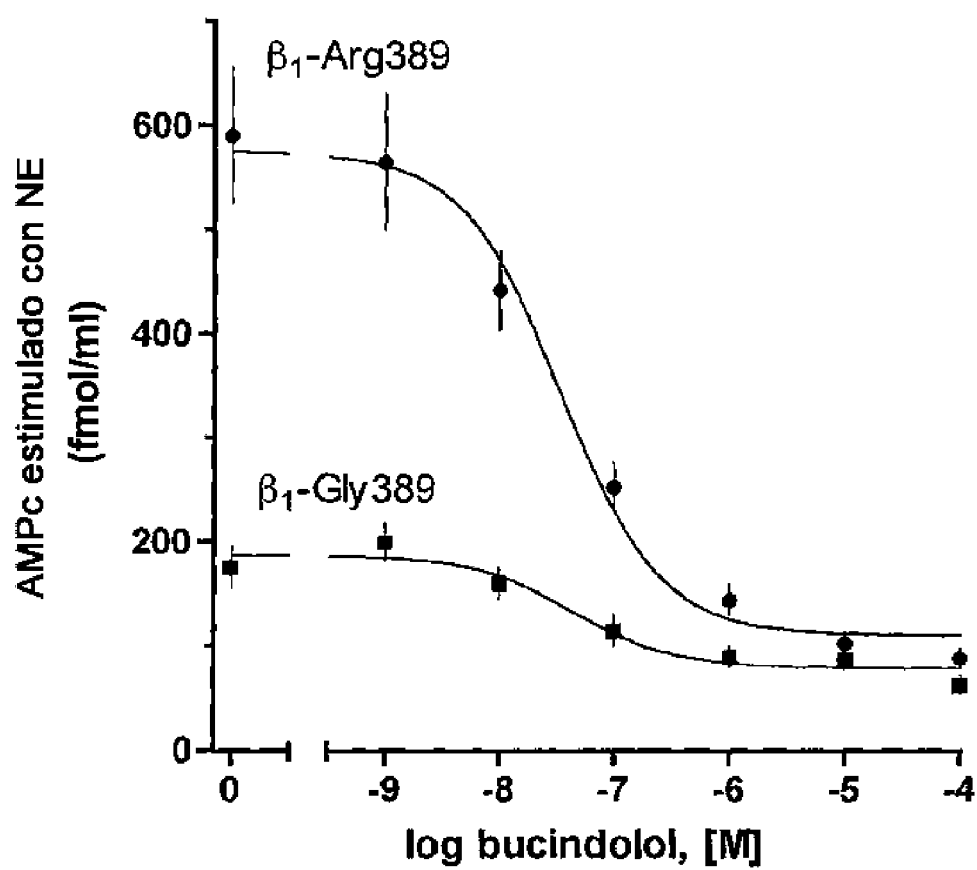


FIG. 3

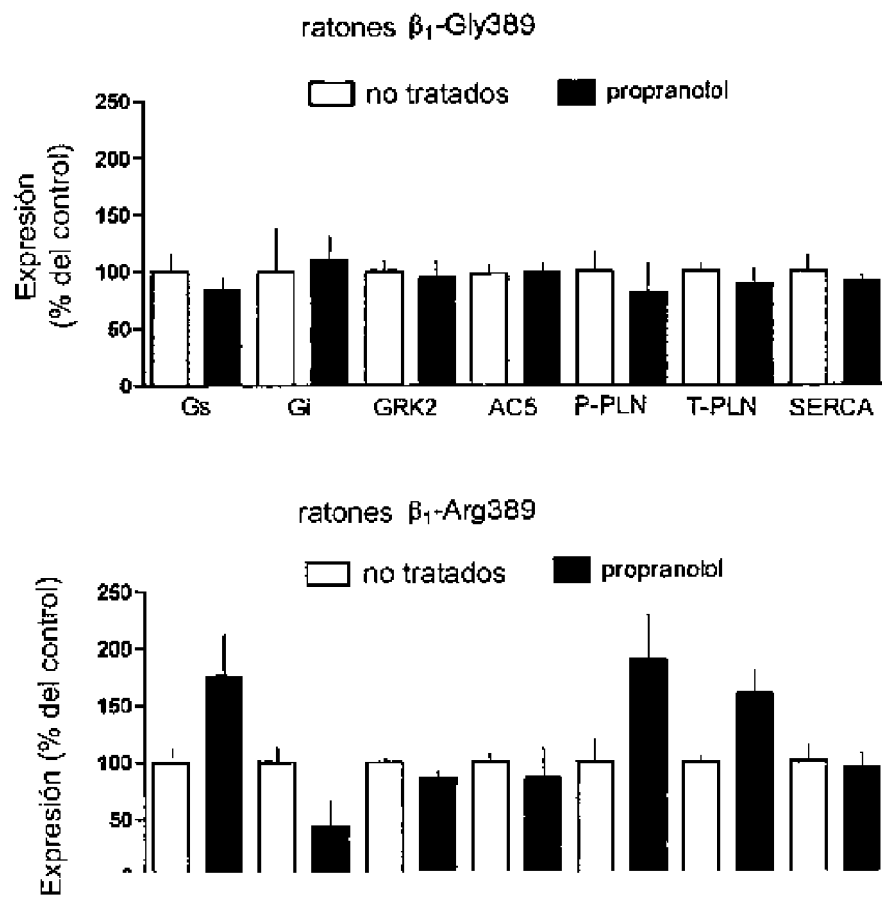


FIG. 4

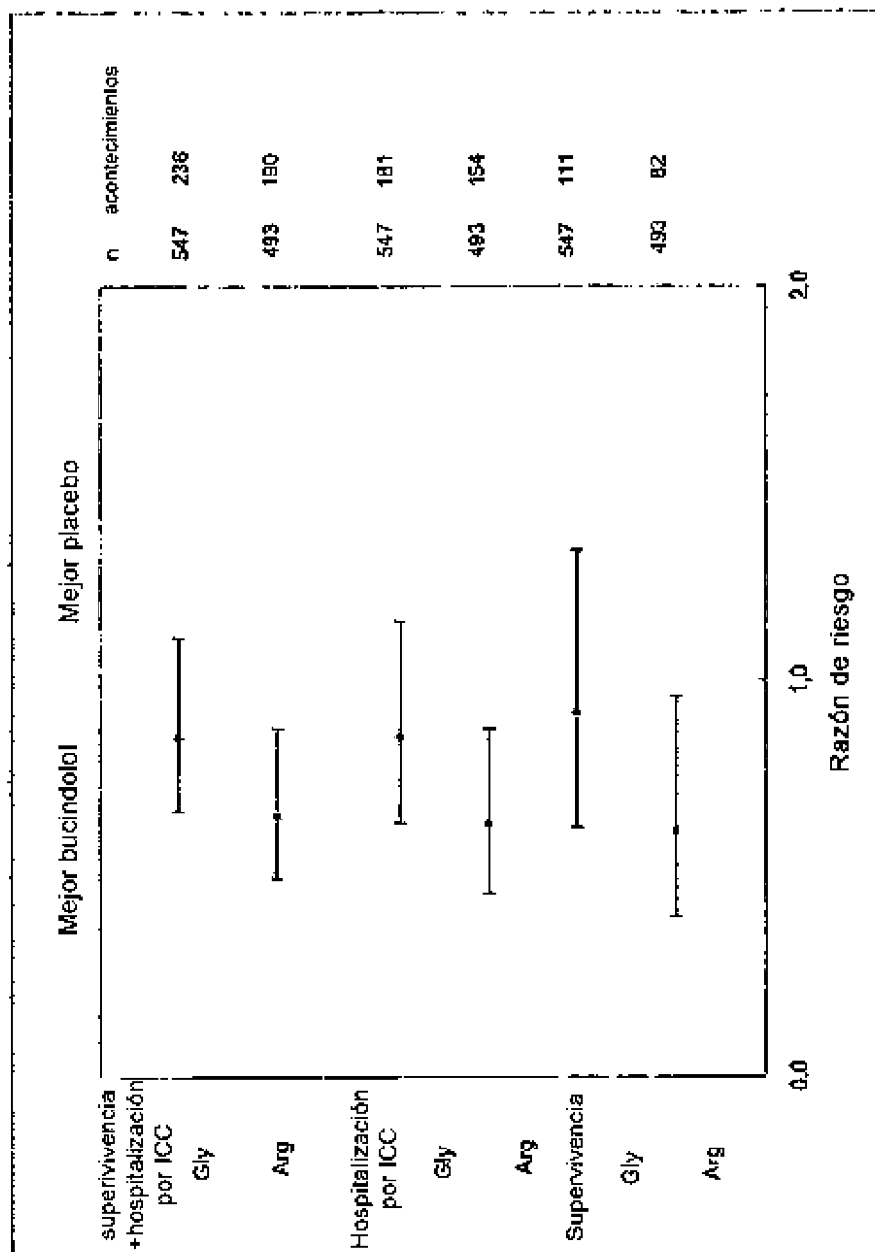


FIG. 5

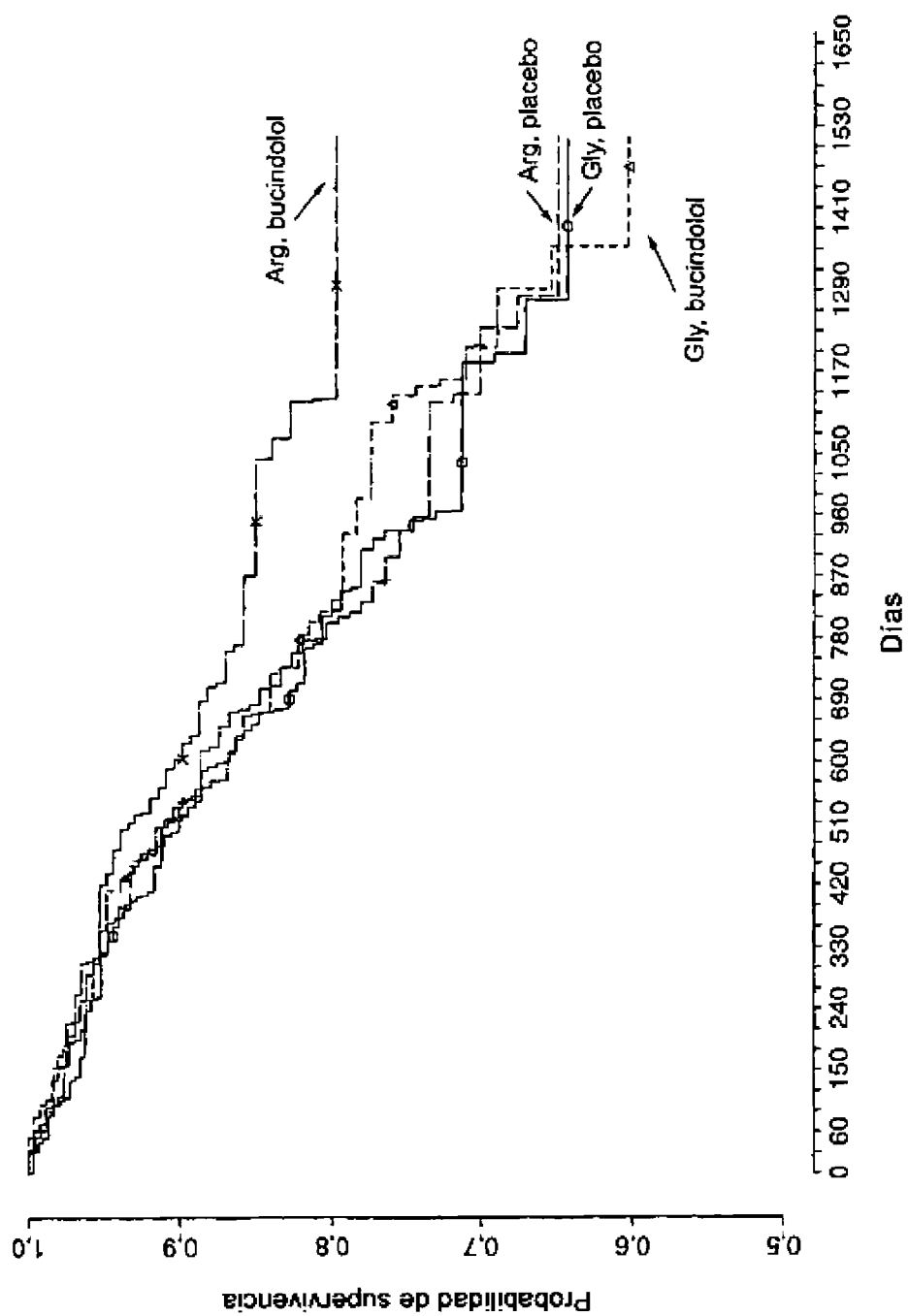


FIG. 6

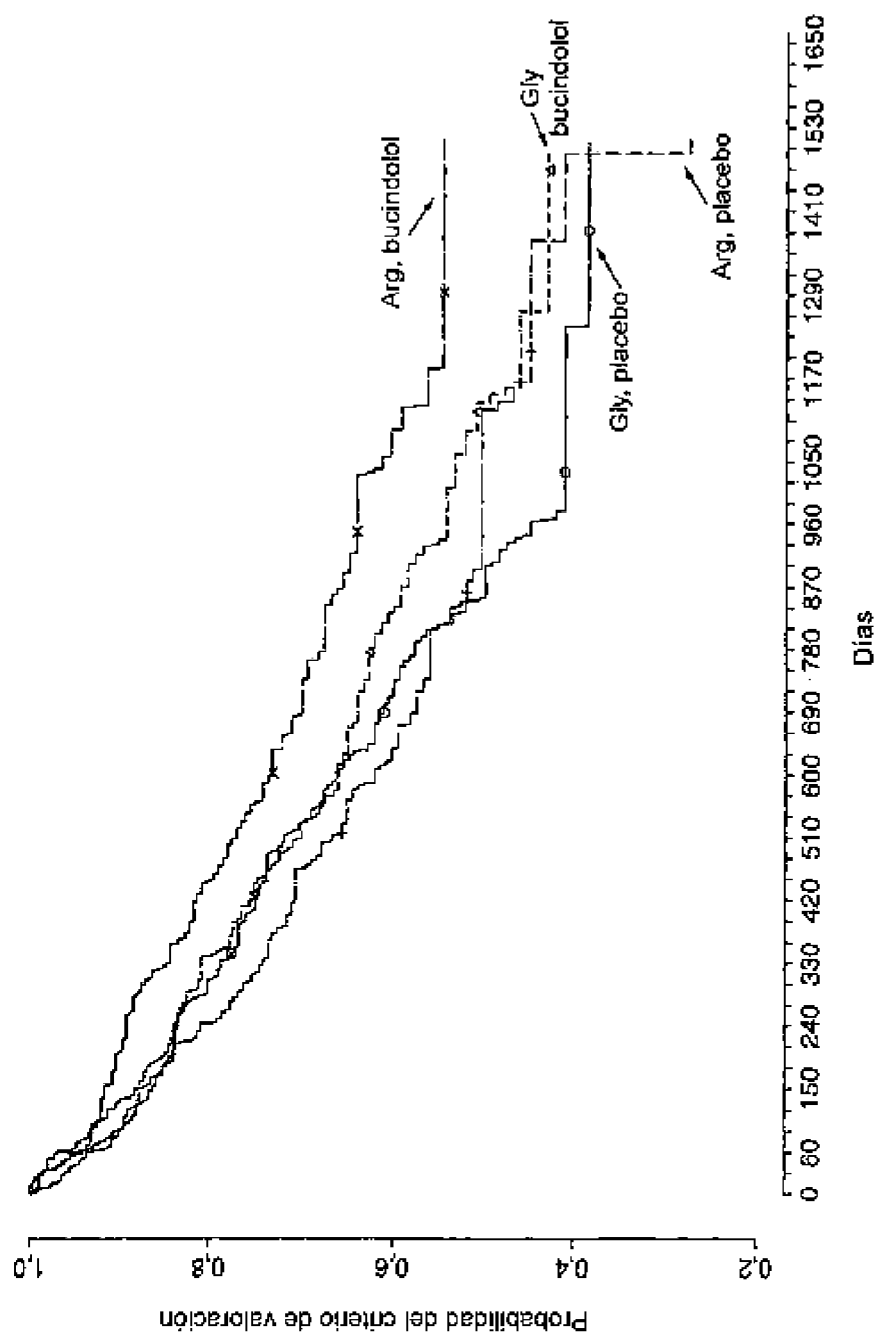


FIG. 7

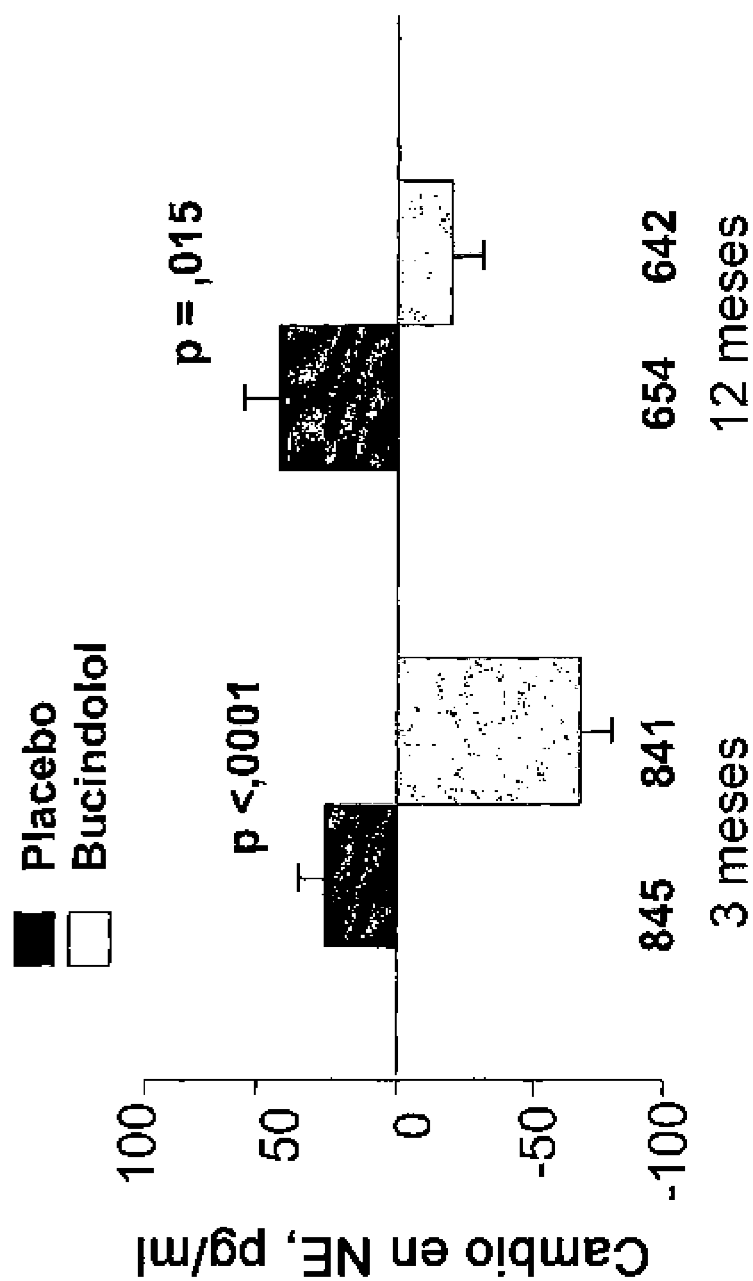


FIG. 8

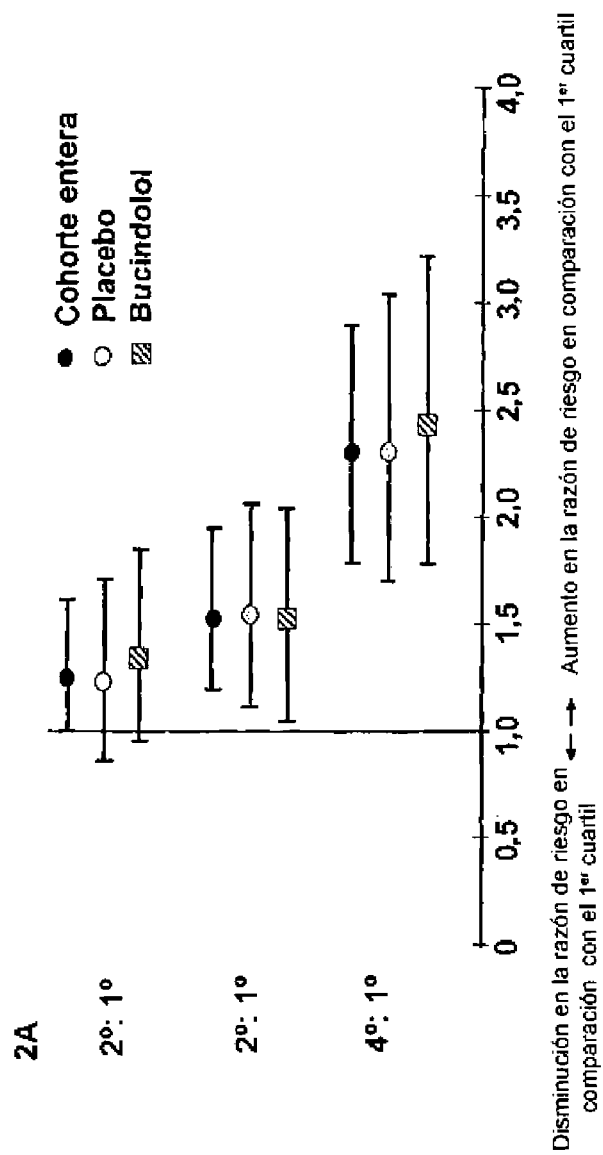


FIG. 9

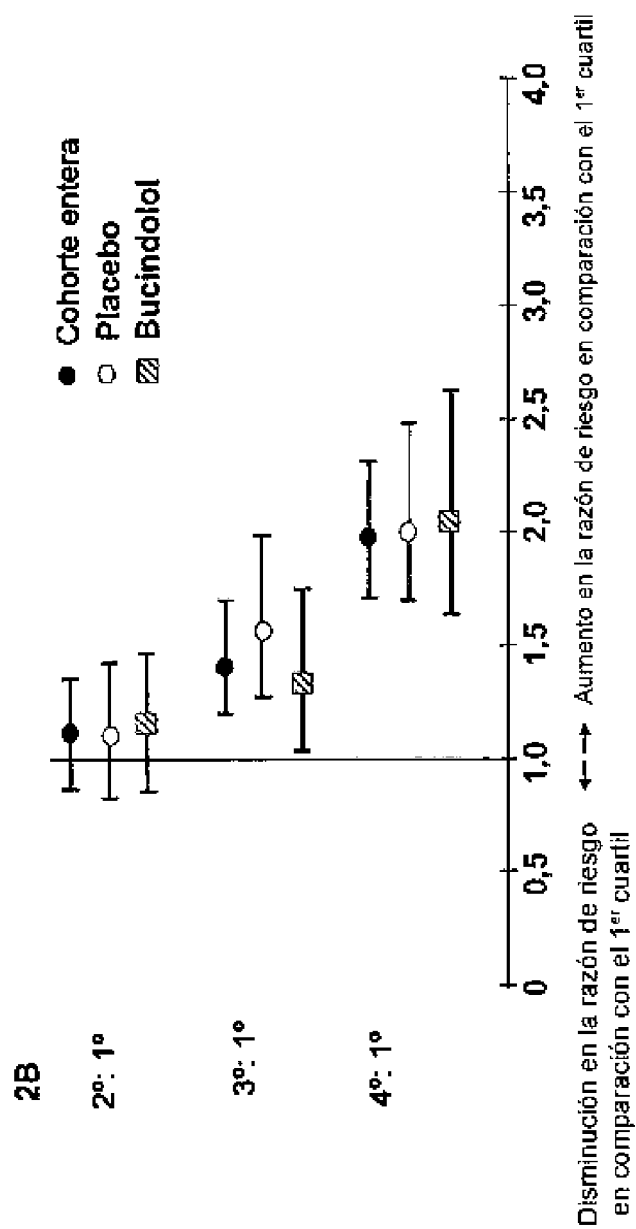


FIG. 10

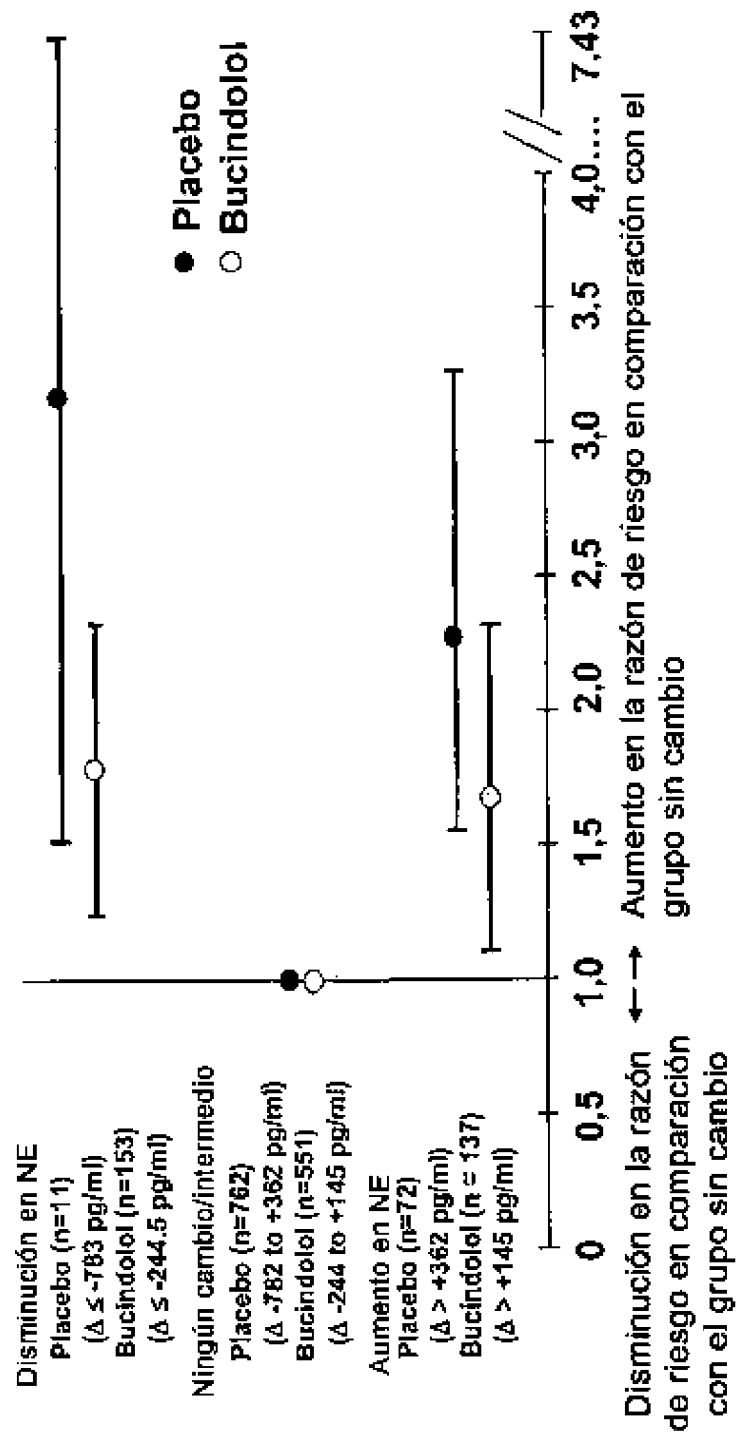


FIG.11

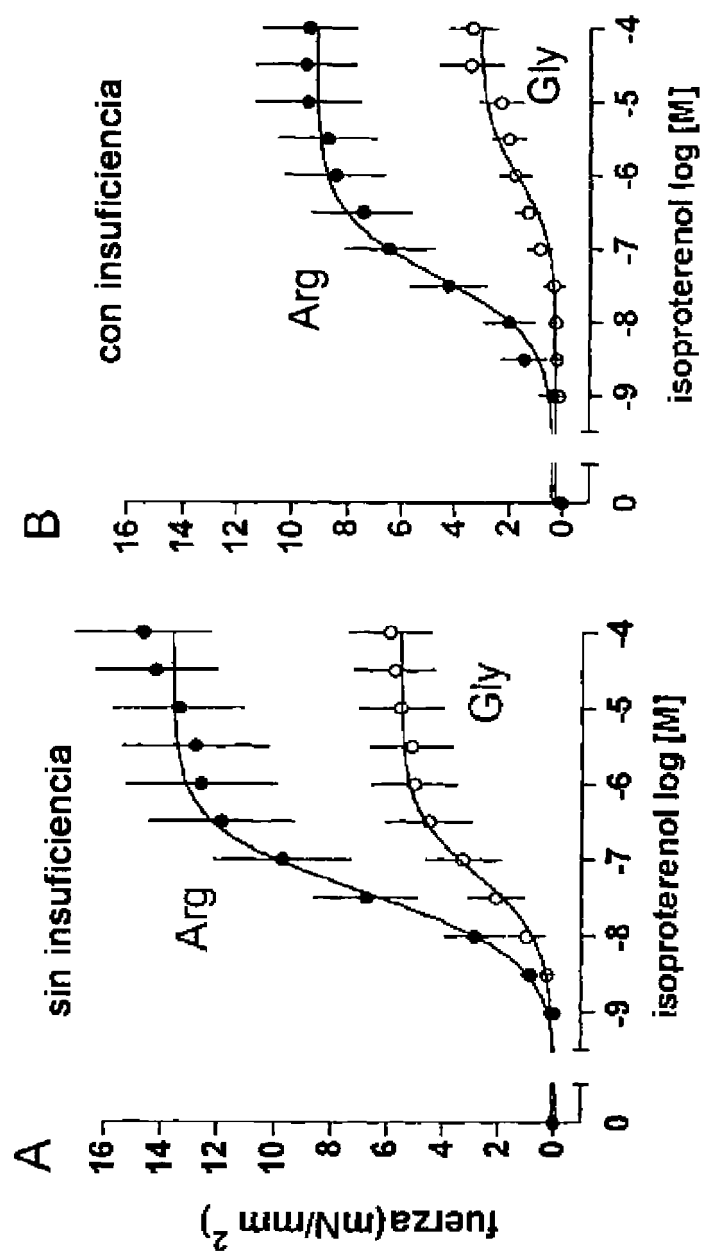


FIG. 12

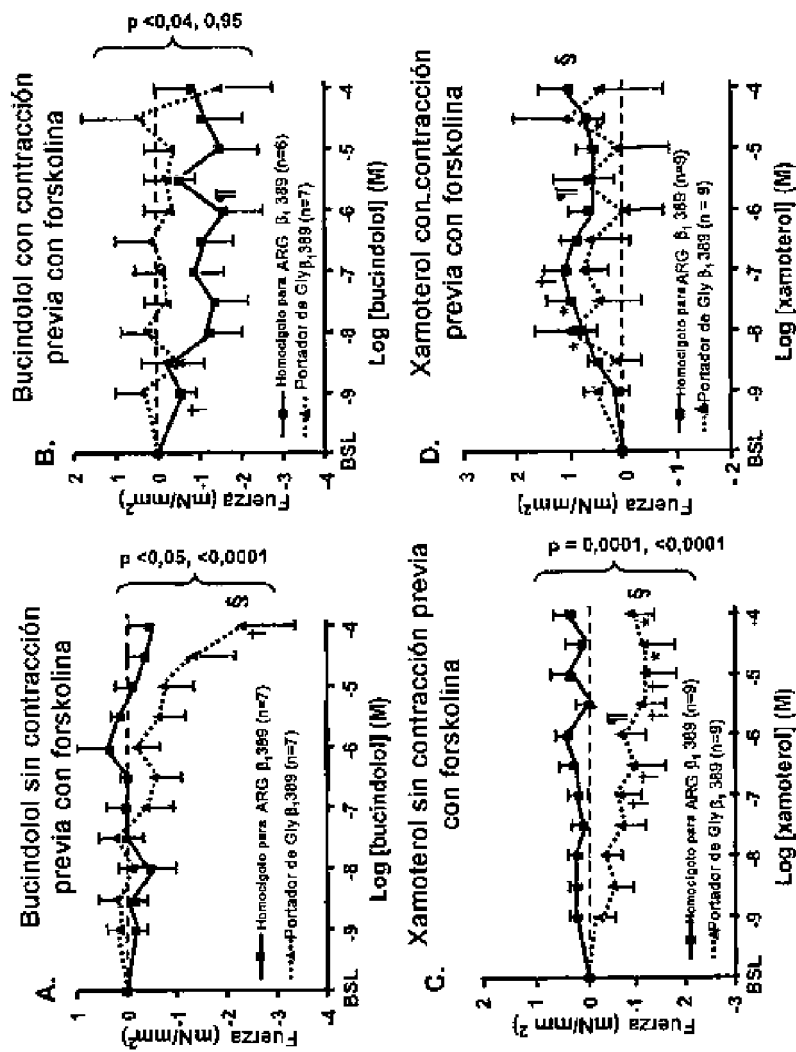


FIG. 13

Consecuencias antitéticas de la estimulación adrenérgica β_1 miocárdica crónica

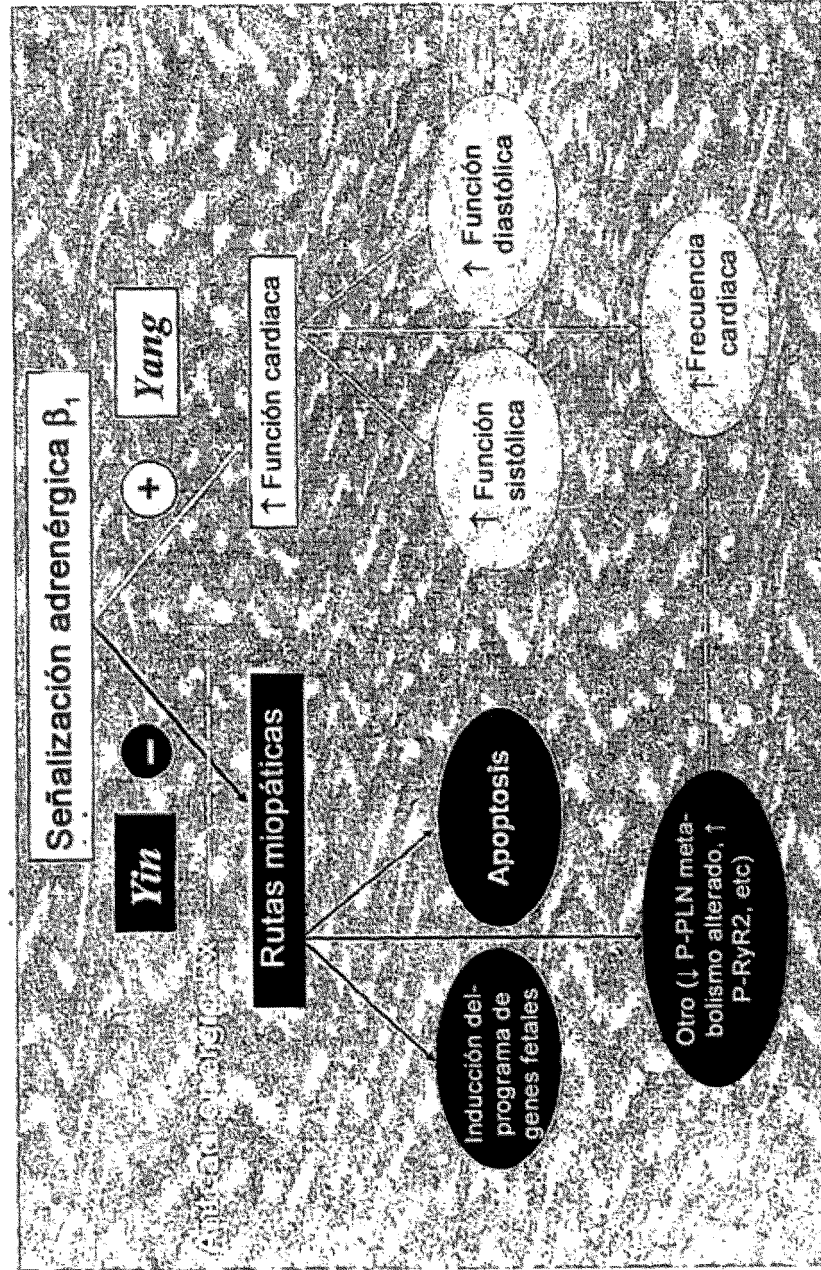


FIG. 14

Características de grupos de riesgo con cambio de NE,
pacientes tratados con bucindolol ($\pm$ DE) (1)

Parámetro	NE $\Delta > 244,5$ (n = 153)	NE $\Delta \leq 244,5$, + 145 (n = 551)	NE $\Delta > 145$ (n = 137)
NE inicial pg/ml	932* ± 544	422 ± 189	409 ± 199
Δ NE a los 3 meses, pg/ml	-529* ± 458	-44 ± 103	-326* ± 244
Clase III/IV	86/14*	93/7	93/7
FC inicial, LPM	85.5* ± 13.8	81.0 ± 13.0	80.6 ± 13.7
Cambio de FC a los 3 meses	-13.6* ± 14.8	-9.7 ± 12.4	-7.1* ± 12.8
Edad	60.1 ± 12.2	60.7 ± 12.1	62.0 ± 12.7
Genero (%M/F)	79/21 ^{ns}	81/19	82/18

p<0,05 frente a grupo intermedio; #, p<0,10 frente a grupo intermedio

FIG. 15

**Características de grupos de riesgo con cambio de NE,
pacientes tratados con bucindolol ($\pm$ DE) (2)**

Parámetro	NE $\Delta > -244,5$ (n = 153)	NE $\Delta \leq -244,5, +$ 145 (n = 551)	NE $\Delta > 145$ (n = 137)
Número de muertes (%)	52 (34%)*	114 (21%)	43 (31%)
Duración de la ICC meses, mediana	36,0	31,0	31,0
Etiología (% de no isquémico/isquémico)	46/54	42/58	31/69*
Raza (% de sujetos no negros/negros)	74/26#	80/20	77/23
FEV1, unidades de la FE (UFE) como %	20,1* $\pm 8,0$	24,1 $\pm 7,0$	23,3 $\pm 6,7$
FEV2, UFE	32,0* $\pm 13,4$	36,5 $\pm 13,2$	32,2* $\pm 13,0$
Cambio en FEV1 a los 3 meses, UFE	7,0* $\pm 8,4$	5,7 $\pm 7,9$	4,2* $\pm 7,0$

p<0,05 frente al grupo intermedio; #, p<0,10 frente al grupo intermedio

FIG. 16

Genotipo de $\alpha 2c$ -AR y NE sistémica en BEST

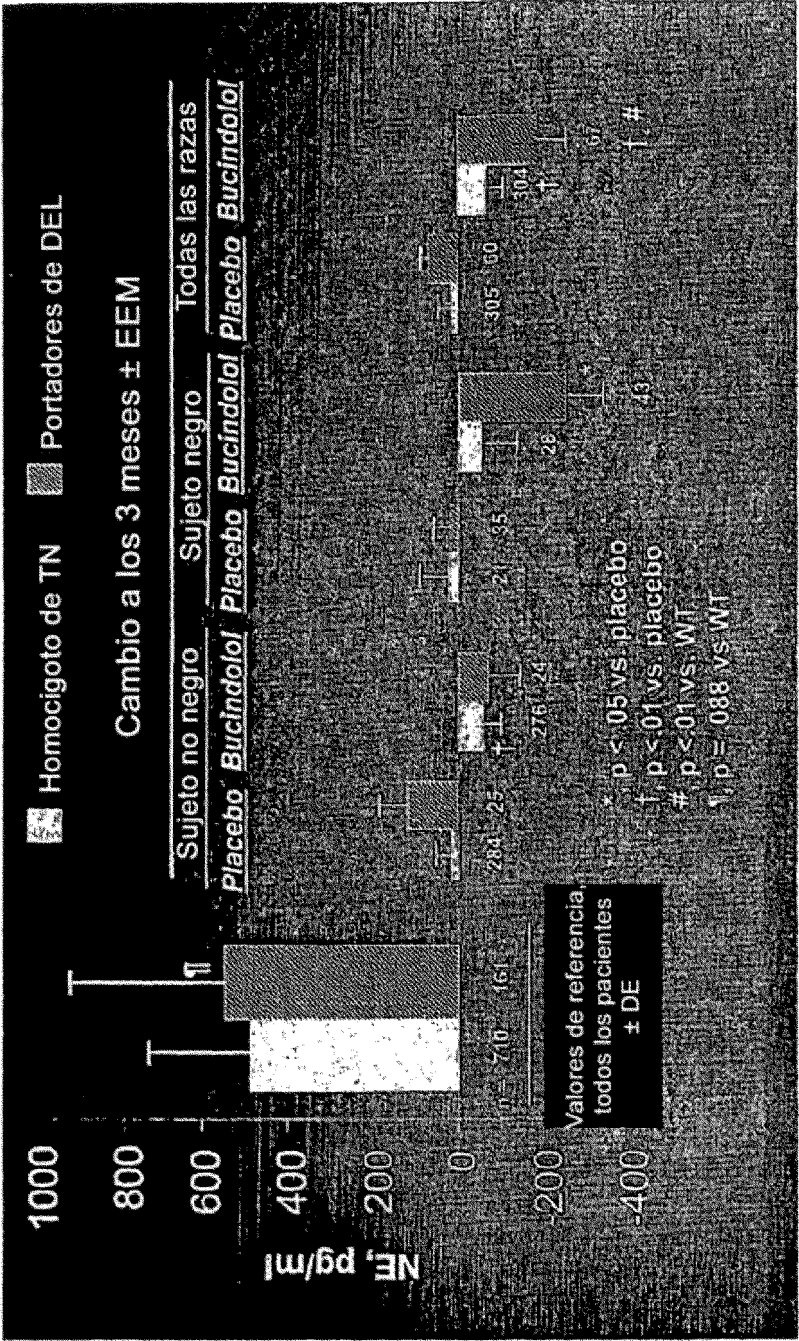


FIG. 17

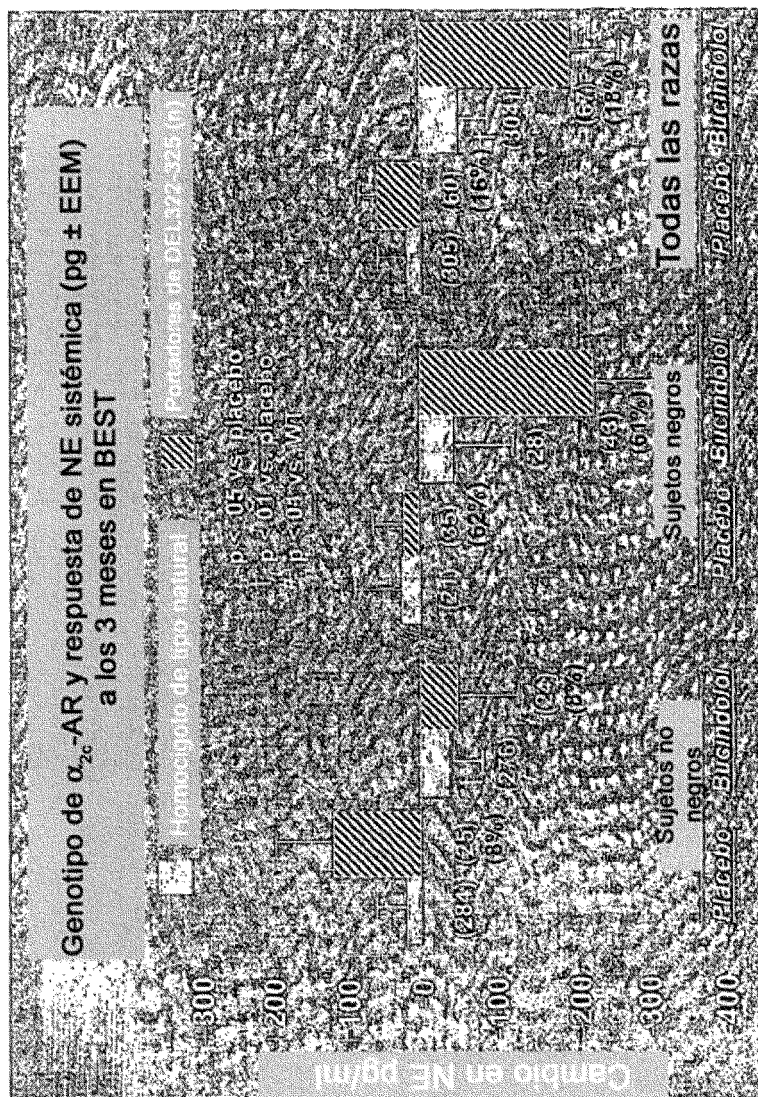


FIG. 18

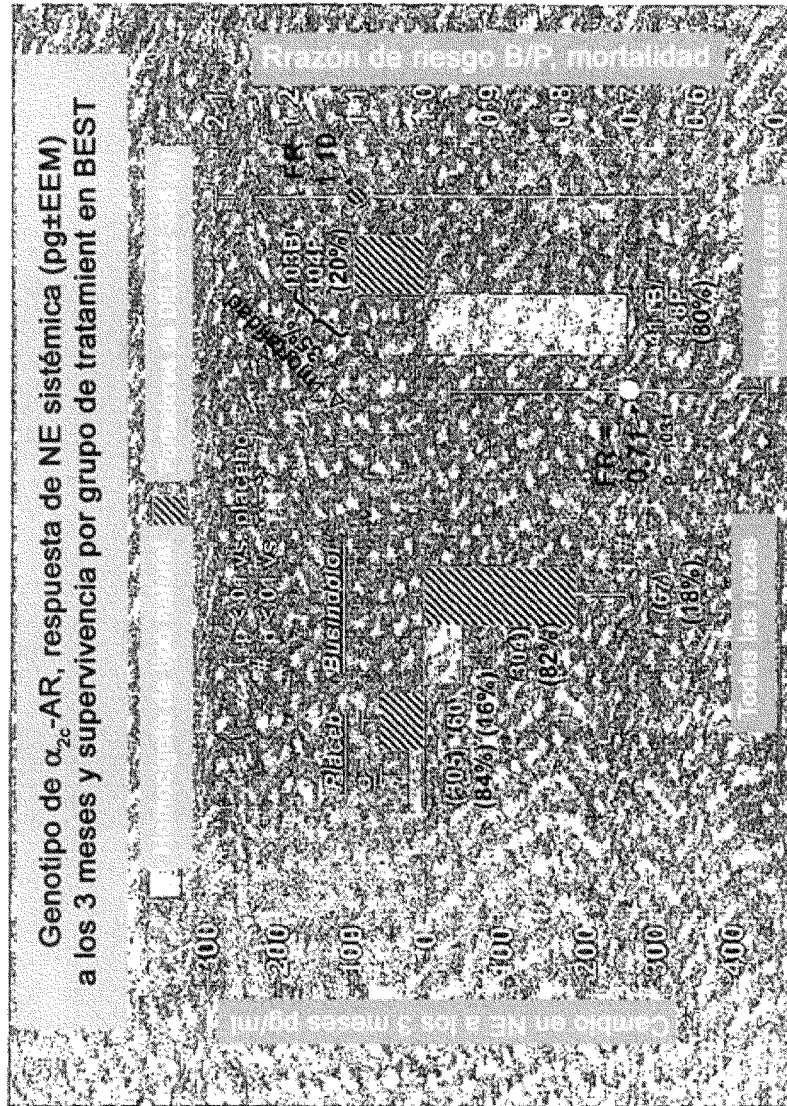


FIG. 19

Efecto de las variantes génicas Arg/Gly 389 de $\beta 1$ -AR sobre la respuesta a isoproterenol en trabéculas de VD humano aisladas

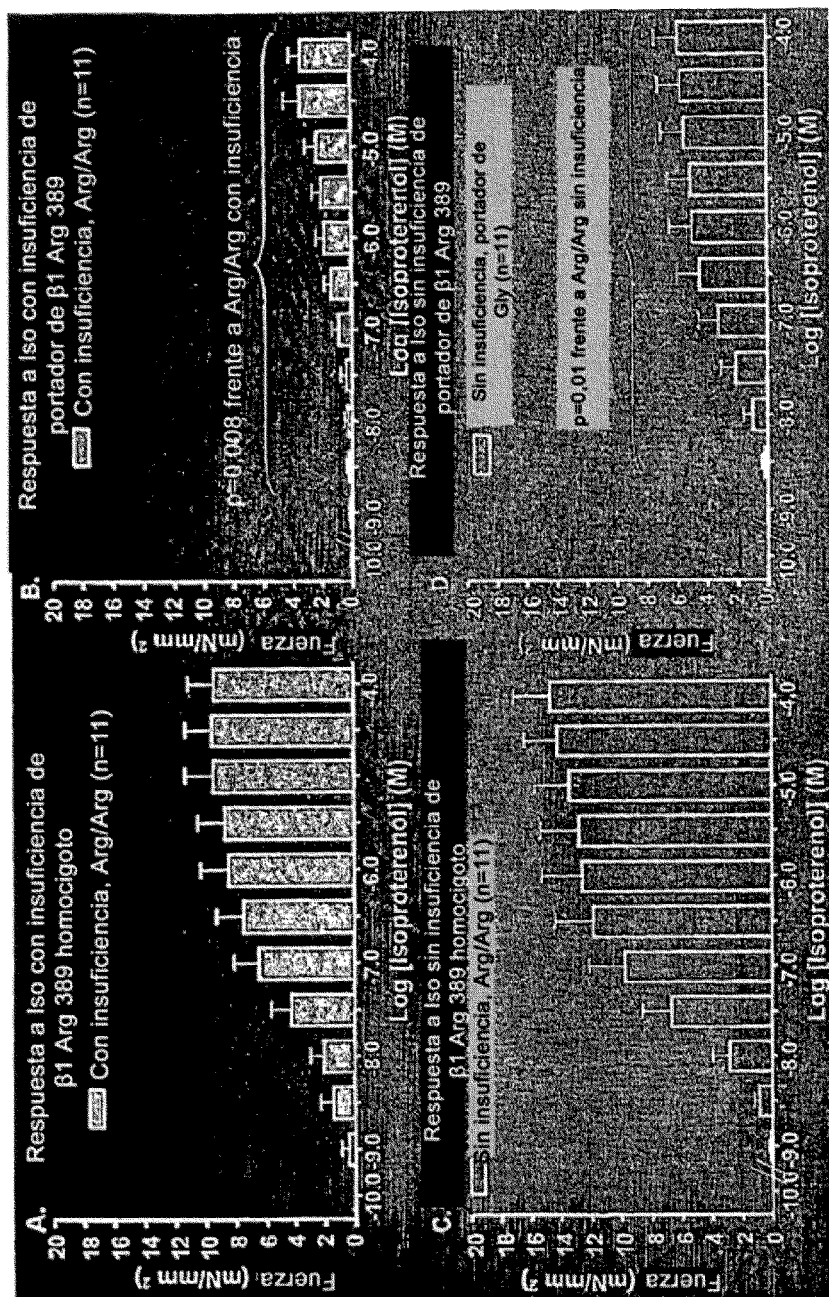


FIG. 20a-d

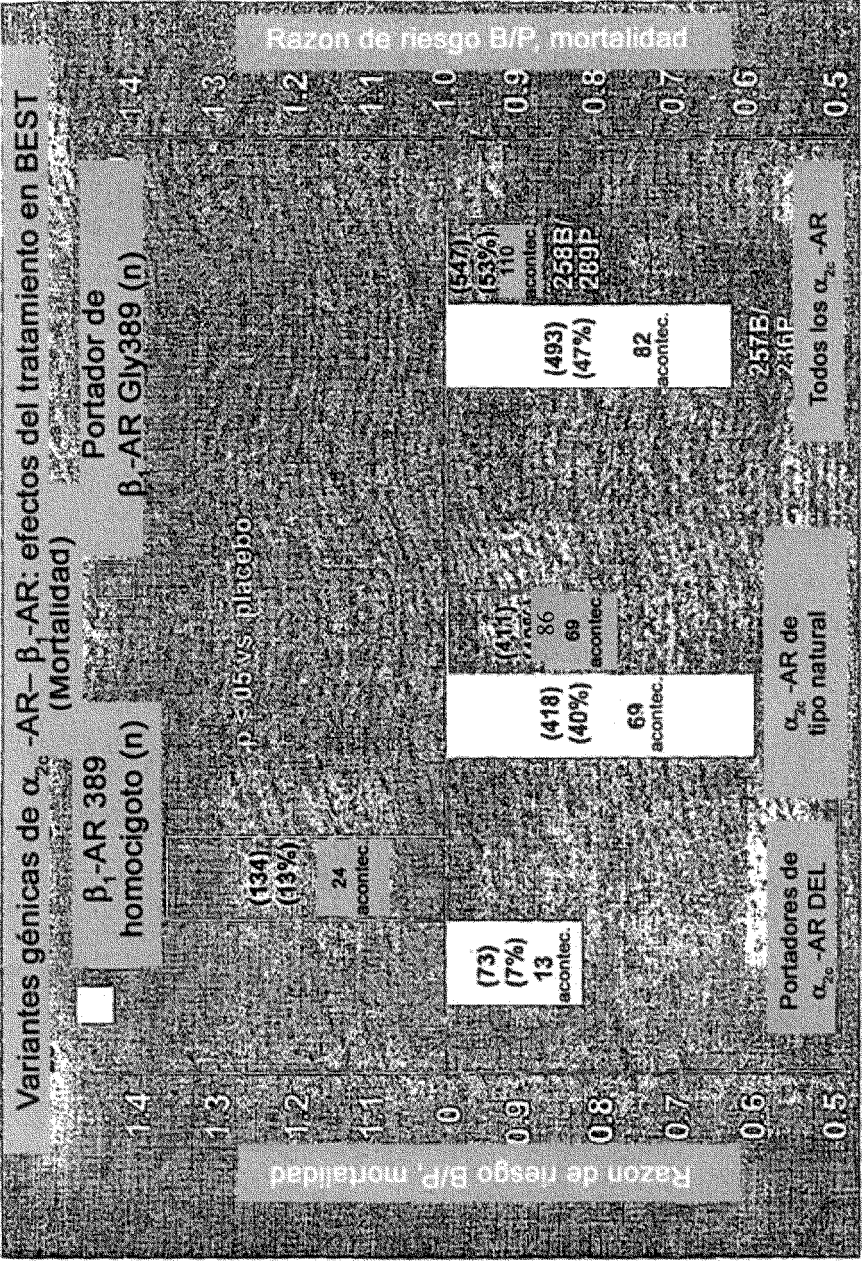


FIG. 21

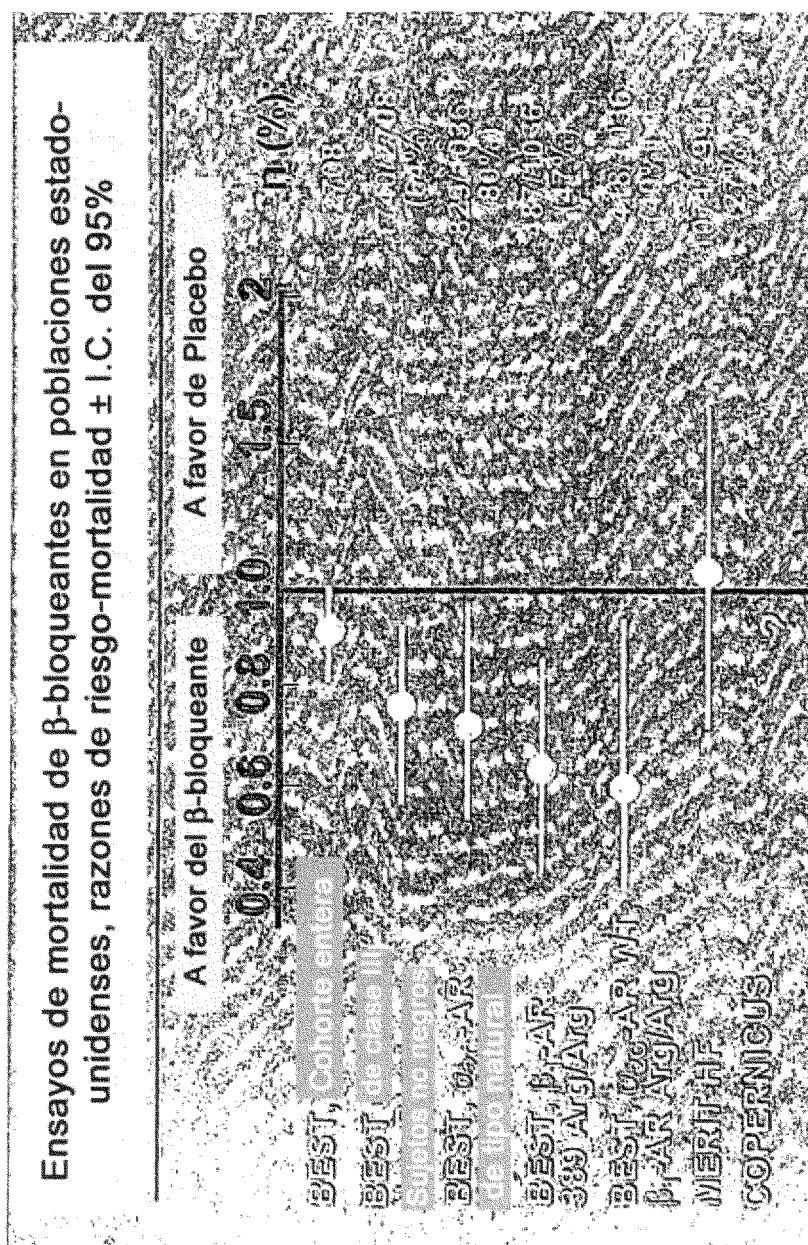


FIG. 22

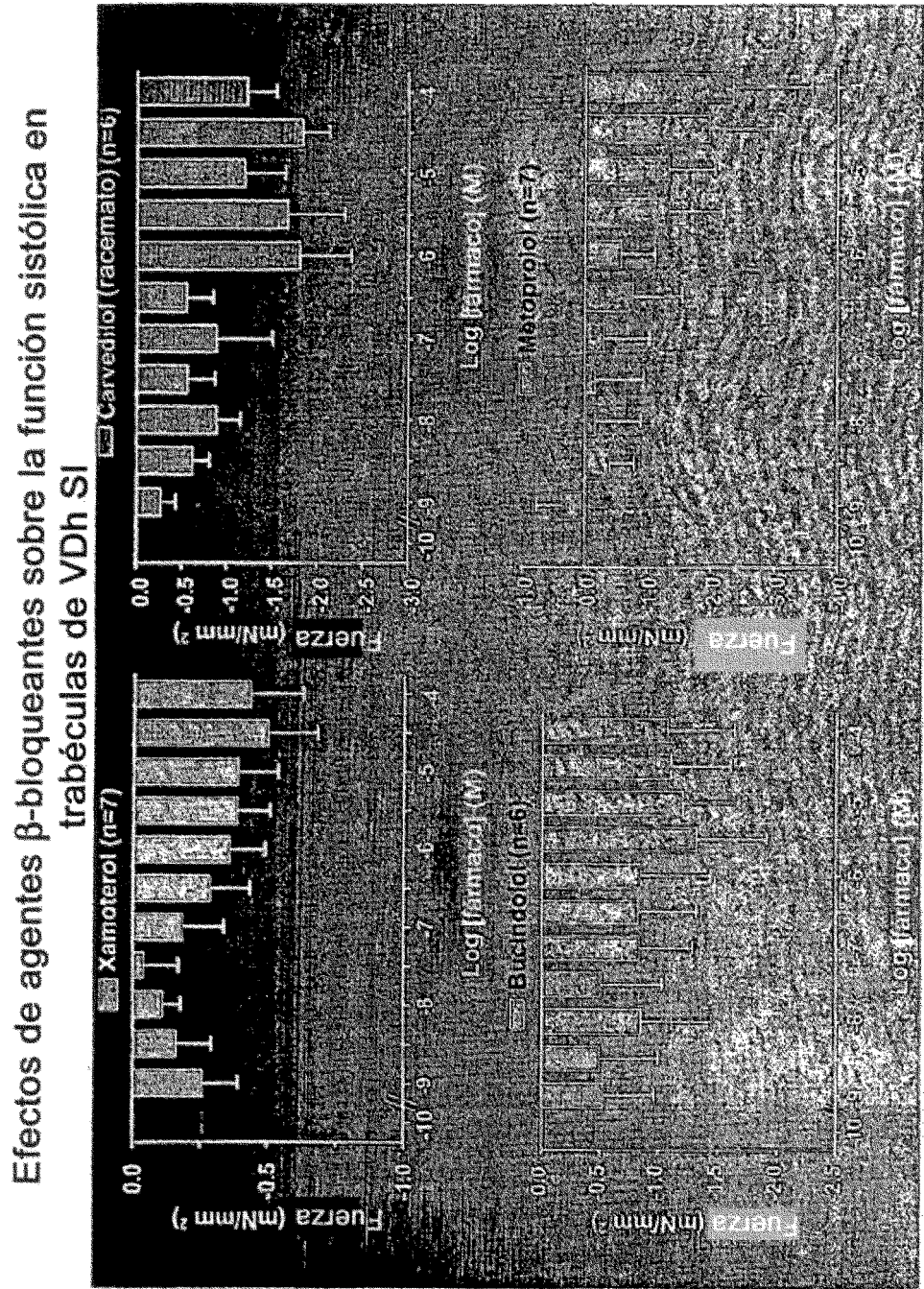


FIG. 23

Efecto de agentes β -bloqueantes sobre la función sistólica en trabéculas de VDh SI, con amplificación de la trasducción de señales con forskolina 10 μ M (F)

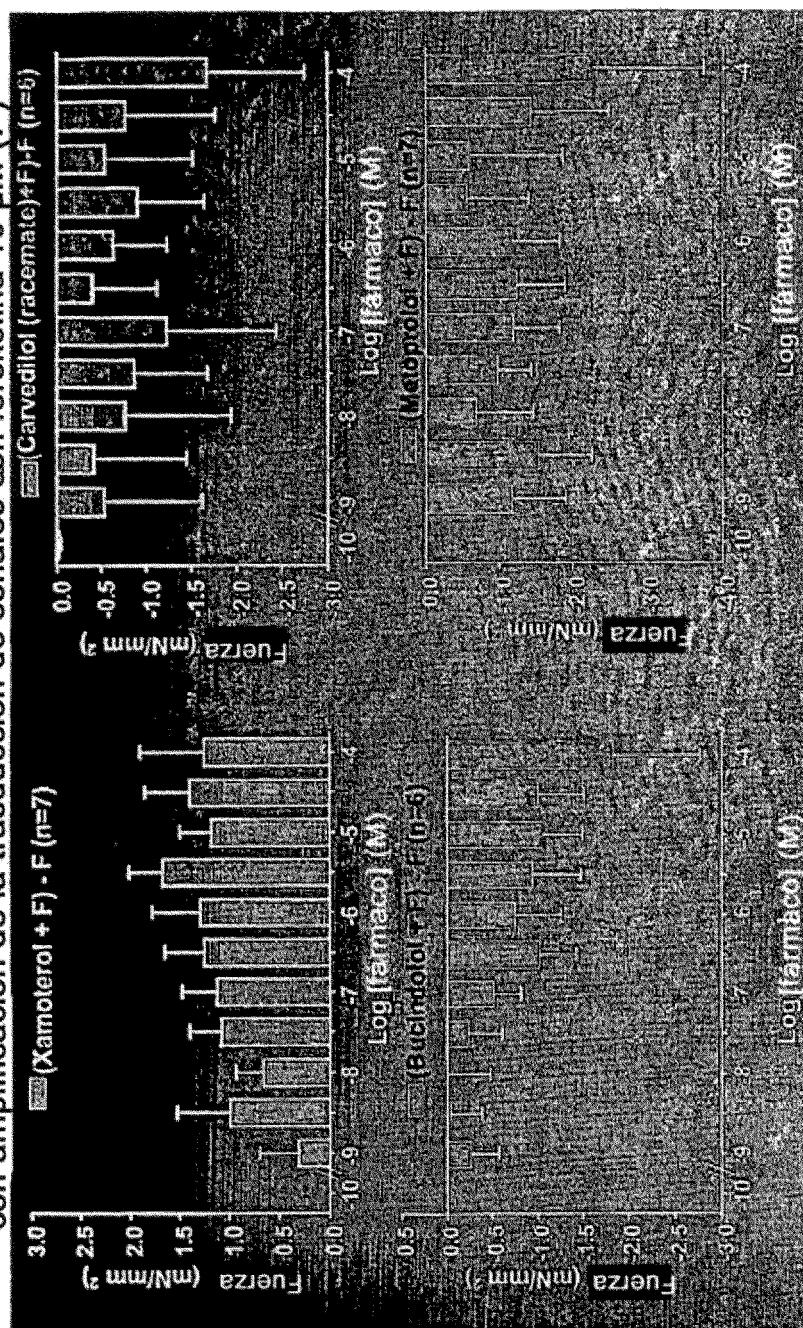


FIG. 24

Efecto de agentes β -bloqueantes sobre la función sistólica en trabéculas de VDh con insuficiencia -

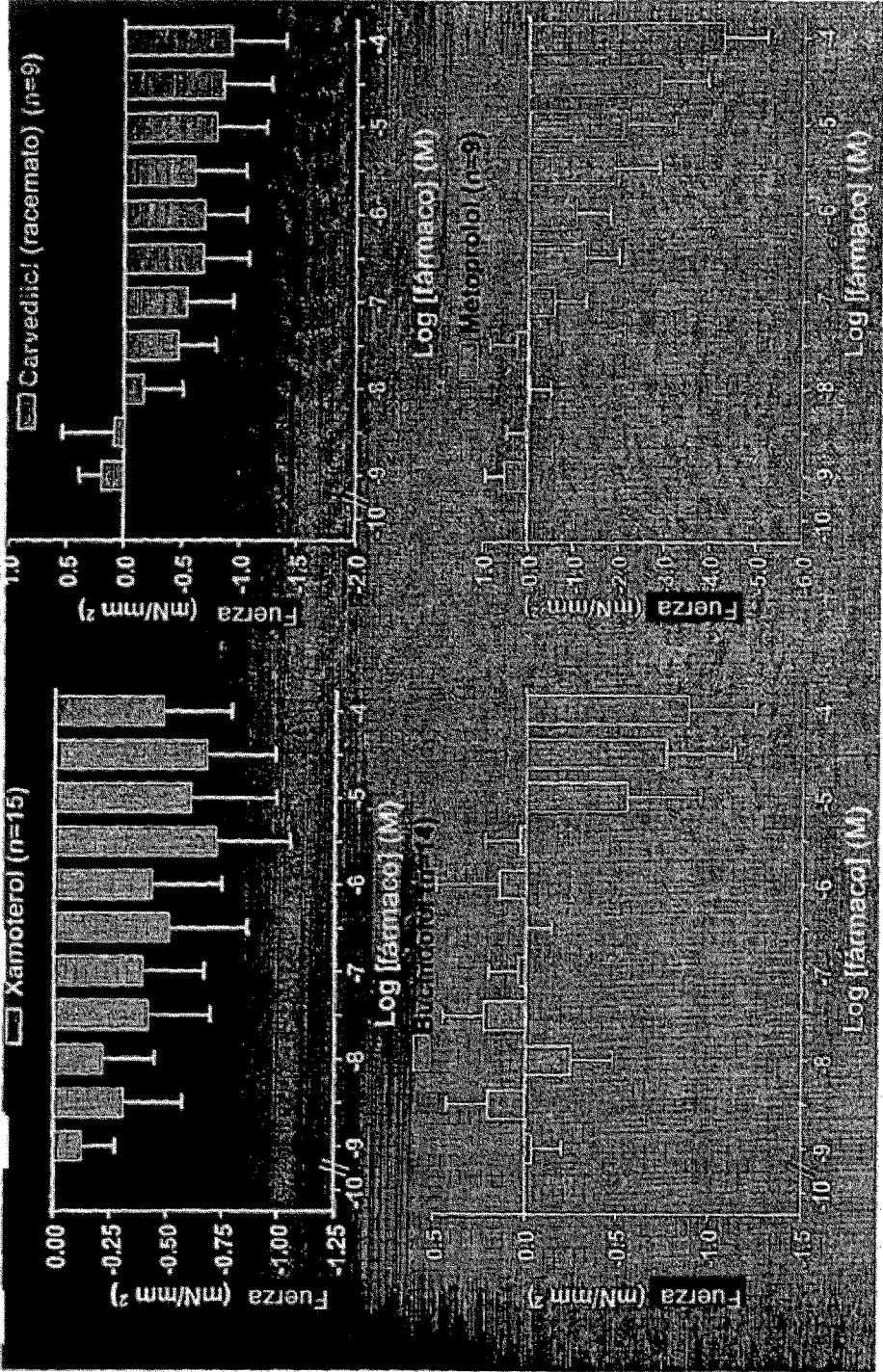


FIG. 25

Efecto de agentes β -bloqueantes sobre la función sistólica en trabéculas de VDh con insuficiencia, con amplificación de la trasducción de señales mediante forskolina $10 \mu\text{M}$ (F)

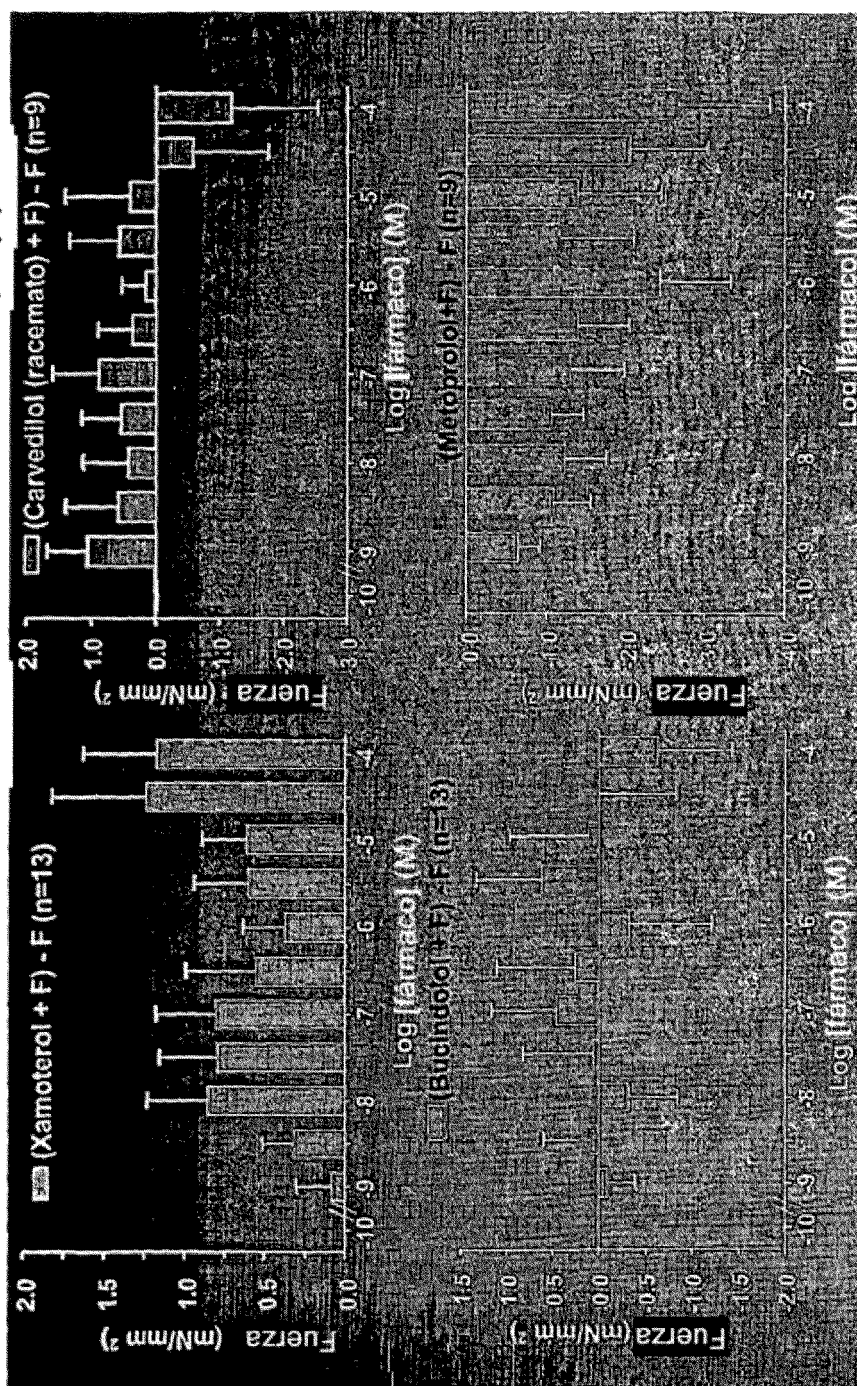


FIG. 26

Diseño I del estudio

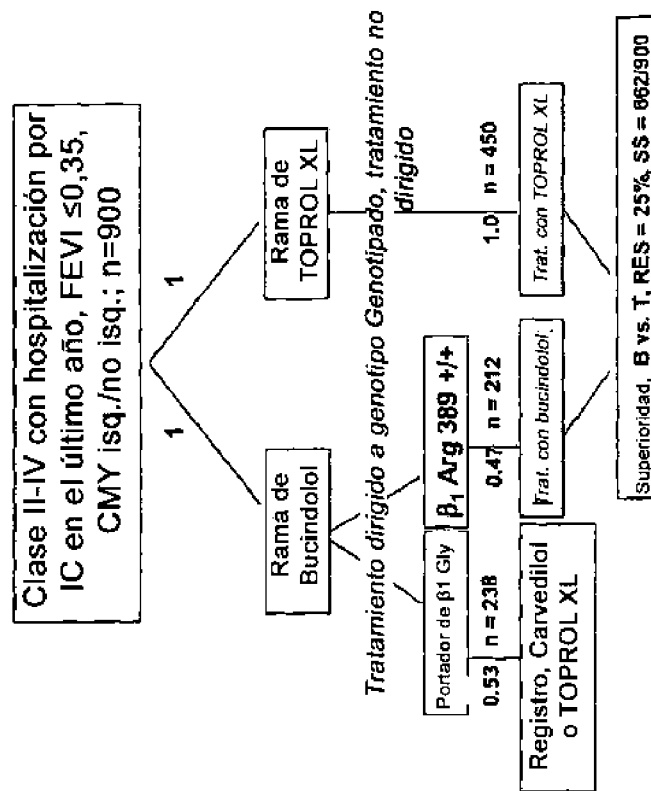


FIG. 27

Diseño II del estudio

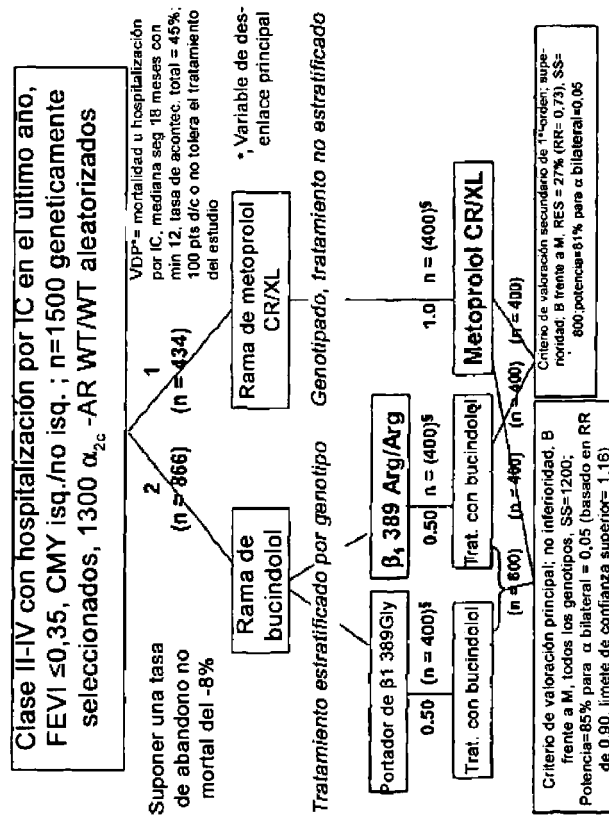


FIG. 28

Diseño III del estudio

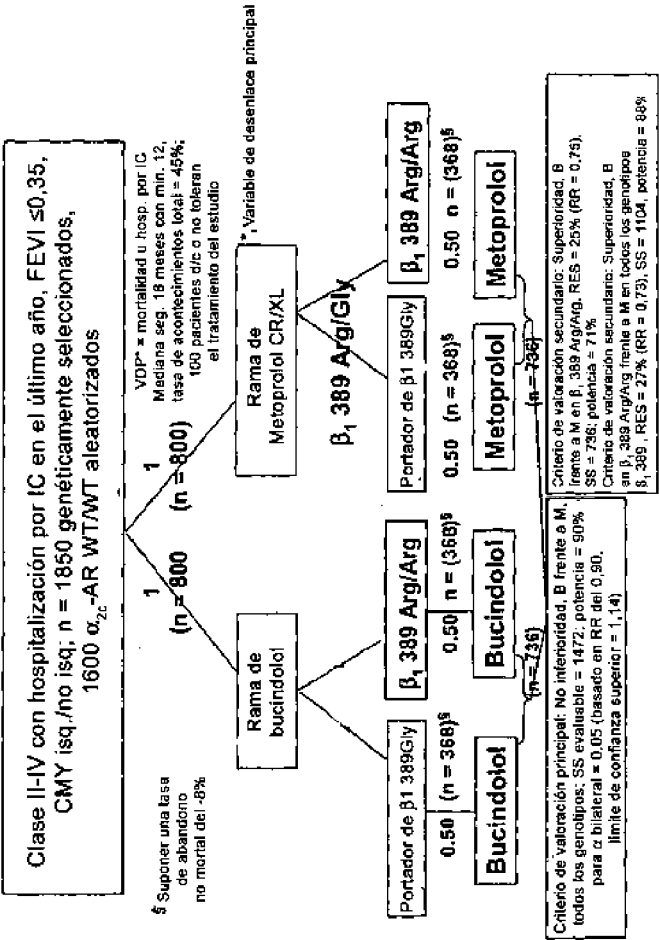


FIG. 29

ES 2 345 993 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> LIGGETT, STEPHEN B.
BRISTOW, MICHAEL

<120> MÉTODO PARA EL TRATAMIENTO CON BUCINDOLOL BASADOS EN DIRECCIONAMIENTO GENÉTICO

<130> ARCA:003US

<140> DESCONOCIDO

<141> 14-09-2005

<150> 60/609/689

<151> 14-09-2004

<150> 60/610.706

<151> 17-09-2004

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1723

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (87) .. (1520)

<400> 1

```

tgc taccgc gccgggctt ctgggggtgtt cccaaccac ggccagccc tgccacaccc 60
ccgcccccg gcctccgcag ctgggc atg ggc gcg ggg gtg ctc gtc ctg ggc 113
                               Met Gly Ala Gly Val Leu Val Leu Gly
                               1           5

gcc tcc gag ccc ggt aac ctg tcg tcg gcc gca ccg ctc ccc gac ggc 161
Ala Ser Glu Pro Gly Asn Leu Ser Ser Ala Ala Pro Leu Pro Asp Gly
10           15           20           25

gcg gcc acc gcg gcg cgg ctg ctg gtg ccc gcg tcg ccg ccc gcc tcg 209
Ala Ala Thr Ala Ala Arg Leu Leu Val Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser
30           35           40

ttg ctg cct ccc gcc agc gaa agc ccc gag ccg ctg tct cag cag tgg 257
Leu Met Pro Thr Ala Ser Glu Ser Pro Glu Pro Leu Ser Gln Gln Trp
45           50           55

aca gcg ggc atg ggt ctg ctg atg gcg ctc atc gtg ctg ctc atc gtg 305
Thr Ala Gly Met Gly Leu Leu Met Ala Leu Ile Val Leu Leu Ile Val
60           65           70

gcg ggc aat gtg ctg gtg atc gtg gcc atc gcc aag acg ccg cgg ctg 353
Ala Gly Asn Val Leu Val Ile Val Ala Ile Ala Lys Thr Pro Arg Leu

```

ES 2 345 993 T3

	75	80	85	
5	cag acg ctc acc aac ctc ttc atc atg tcc ctg gcc agc gcc gac ctg Gln Thr Leu Thr Asn Leu Phe Ile Met Ser Leu Ala Ser Ala Asp Leu 90 95 100 105	401		
10	gtc atg ggg ctg ctg gtg gtg ccg ttc ggg gcc acc atc gtg gtg tgg Val Met Gly Leu Leu Val Val Pro Phe Gly Ala Thr Ile Val Val Trp 110 115 120	449		
15	ggc cgc tgg gag tac ggc tcc ttc ttc tgc gag ctg tgg acc tca gtg Gly Arg Trp Glu Tyr Gly Ser Phe Phe Cys Glu Leu Trp Thr Ser Val 125 130 135	497		
20	gac gtg ctg tgc gtg acg gcc agc atc gag acc ctg tgt gtc att gcc Asp Val Leu Cys Val Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Cys Val Ile Ala 140 145 150	545		
25	ctg gac cgc tac ctc gcc atc acc tcg ccc ttc cgc tac cag agc ctg Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Thr Ser Pro Phe Arg Tyr Gln Ser Leu 155 160 165	593		
30	ctg acg cgc gcg cgg gcg cgg ggc ctc gtg tgc acc gtg tgg gcc atc Leu Thr Arg Ala Arg Ala Arg Gly Leu Val Cys Thr Val Trp Ala Ile 170 175 180 185	641		
35	tcg gcc ctg gtg tcc ttc ctg ccc atc ctc atg cac tgg tgg cgg gcg Ser Ala Leu Val Ser Phe Leu Pro Ile Leu Met His Trp Trp Arg Ala 190 195 200	689		
40	gag agc gac gag gcg cgc cgc tgc tac aac gac ccc aag tgc tgc gac Glu Ser Asp Glu Ala Arg Arg Cys Tyr Asn Asp Pro Lys Cys Cys Asp 205 210 215	737		
45	ttc gtc acc aac cgg gcc tac gcc atc gcc tcg tcc gta gtc tcc ttc Phe Val Thr Asn Arg Ala Tyr Ala Ile Ala Ser Ser Val Val Ser Phe 220 225 230	785		
50	tac gtg ccc ctg tgc atc atg gcc ttc gtg tac ctg cgg gtg ttc cgc Tyr Val Pro Leu Cys Ile Met Ala Phe Val Tyr Leu Arg Val Phe Arg 235 240 245	833		
55	gag gcc cag aag cag gtg aag aag atc gac agc tgc gag cgc cgt ttc Glu Ala Gln Lys Gln Val Lys Lys Ile Asp Ser Cys Glu Arg Arg Phe 250 255 260 265	881		
60	ctc ggc ggc cca gcg cgg ccg ccc tcg ccc tcg ccc tcg ccc gtc ccc Leu Gly Gly Pro Ala Arg Pro Pro Ser Pro Ser Pro Ser Pro Val Pro 270 275 280	929		
65	gcg ccc gcg ccg ccg ccc gga ccc ccg cgc ccc gcc gcc gcc gcc gcc Ala Pro Ala Pro Pro Pro Gly Pro Pro Arg Pro Ala Ala Ala Ala Ala 285 290 295	977		
	acc gcc ccg ctg gcc aac ggg cgt gcg ggt aag cgg cgg ccc tcg cgc Thr Ala Pro Leu Ala Asn Gly Arg Ala Gly Lys Arg Arg Pro Ser Arg 300 305 310	1025		

ES 2 345 993 T3

ctc gtg gcc cta cgc gag cag aag gcg ctc aag acg ctg ggc atc atc 1073
 Leu Val Ala Leu Arg Glu Gln Lys Ala Leu Lys Thr Leu Gly Ile Ile
 315 320 325
 5 atg ggc gtc ttc acg ctc tgc tgg ctg ccc ttc ttc ctg gcc aac gtg 1121
 Met Gly Val Phe Thr Leu Cys Trp Leu Pro Phe Phe Leu Ala Asn Val
 330 335 340 345
 10 gtg aag gcc ttc cac cgc gag ctg gtg ccc gac cgc ctc ttc gtc ttc 1169
 Val Lys Ala Phe His Arg Glu Leu Val Pro Asp Arg Leu Phe Val Phe
 350 355 360
 15 ttc aac tgg ctg gcc tac gcc aac tcg gcc ttc aac ccc atc atc tac 1217
 Phe Asn Trp Leu Gly Tyr Ala Asn Ser Ala Phe Asn Pro Ile Ile Tyr
 365 370 375
 tgc cgc agc ccc gac ttc cgc aag gcc ttc cag gga ctg ctc tgc tgc 1265
 Cys Arg Ser Pro Asp Phe Arg Lys Ala Phe Gln Gly Leu Leu Cys Cys
 380 385 390
 20 gcg cgc agg gct gcc cgc cgg cgc cac gcg acc cac gga gac cgg ccg 1313
 Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg Arg His Ala Thr His Gly Asp Arg Pro
 395 400 405
 25 cgc gcc tcg ggc tgt ctg gcc cgg ccc gga ccc ccg cca tcg ccc ggg 1361
 Arg Ala Ser Gly Cys Leu Ala Arg Pro Gly Pro Pro Ser Pro Gly
 410 415 420 425
 30 gcc gcc tcg gac gac gac gac gac gat gtc gtc ggg gcc acg ccg ccc 1409
 Ala Ala Ser Asp Asp Asp Asp Asp Val Val Gly Ala Thr Pro Pro
 430 435 440
 gcg cgc ctg ctg gag ccc tgg gcc ggc tgc aac ggc ggg gcg gcg gcg 1457
 Ala Arg Leu Leu Glu Pro Trp Ala Gly Cys Asn Gly Gly Ala Ala Ala
 445 450 455
 35 gac agc gac tcg agc ctg gac gag ccg tgc cgc ccc ggc ttc gcc tcg 1505
 Asp Ser Asp Ser Ser Leu Asp Glu Pro Cys Arg Pro Gly Phe Ala Ser
 460 465 470
 40 gaa tcc aag gtg tag ggcccgccgc ggggcgcgga ctccgggcac ggcttcccag 1560
 Glu Ser Lys Val
 475
 45 gggaaacgagg agatctgtgt ttacttaaga ccgatagcag gtgaactcga agcccacaat 1620
 cctcgtctga atcatccgag gcaaagagaa aagccacgga ccgttgacaa aaaaggaaag 1680
 tttgggaagg gatgggagag tggcttgctg atgttccttg ttg 1723

<210> 2

<211> 477

55 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

60

65

ES 2 345 993 T3

 $\langle 400 \rangle$ 2

5	Met	Gly	Ala	Gly	Val	Leu	Val	Leu	Gly	Ala	Ser	Glu	Pro	Gly	Asn	Leu
	1				5				10					15		
	Ser	Ser	Ala	Ala	Pro	Leu	Pro	Asp	Gly	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	Arg	Leu
			20					25					30			
	Leu	Val	Pro	Ala	Ser	Pro	Pro	Ala	Ser	Leu	Leu	Pro	Pro	Ala	Ser	Glu
		35					40					45				
10	Ser	Pro	Glu	Pro	Leu	Ser	Gln	Trp	Thr	Ala	Gly	Met	Gly	Leu	Leu	
		50					55				60					
	Met	Ala	Leu	Ile	Val	Leu	Leu	Ile	Val	Ala	Gly	Asn	Val	Leu	Val	Ile
	65					70			75						80	
	Val	Ala	Ile	Ala	Lys	Thr	Pro	Arg	Leu	Gln	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Phe
					85				90					95		
	Ile	Met	Ser	Leu	Ala	Ser	Ala	Asp	Leu	Val	Met	Gly	Leu	Leu	Val	Val
				100				105				110				
	Pro	Phe	Gly	Ala	Thr	Ile	Val	Val	Trp	Gly	Arg	Trp	Glu	Tyr	Gly	Ser
			115				120					125				
20	Phe	Phe	Cys	Glu	Leu	Trp	Thr	Ser	Val	Asp	Val	Leu	Cys	Val	Thr	Ala
		130					135				140					
	Ser	Ile	Glu	Thr	Leu	Cys	Val	Ile	Ala	Leu	Asp	Arg	Tyr	Leu	Ala	Ile
	145					150				155					160	
	Thr	Ser	Pro	Phe	Arg	Tyr	Gln	Ser	Leu	Leu	Thr	Arg	Ala	Arg	Ala	Arg
					165				170					175		
25	Gly	Leu	Val	Cys	Thr	Val	Trp	Ala	Ile	Ser	Ala	Leu	Val	Ser	Phe	Leu
				180				185				190				
	Pro	Ile	Leu	Met	His	Trp	Trp	Arg	Ala	Glu	Ser	Asp	Glu	Ala	Arg	Arg
				195			200					205				
30	Cys	Tyr	Asn	Asp	Pro	Lys	Cys	Cys	Asp	Phe	Val	Thr	Asn	Arg	Ala	Tyr
		210					215					220				
	Ala	Ile	Ala	Ser	Ser	Val	Val	Ser	Phe	Tyr	Val	Pro	Leu	Cys	Ile	Met
	225					230				235					240	
	Ala	Phe	Val	Tyr	Leu	Arg	Val	Phe	Arg	Glu	Ala	Gln	Lys	Gln	Val	Lys
					245					250				255		
35	Lys	Ile	Asp	Ser	Cys	Glu	Arg	Arg	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ala	Arg	Pro
				260				265				270				
	Pro	Ser	Pro	Ser	Pro	Ser	Pro	Val	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Pro	Pro	Gly
			275				280					285				
40	Pro	Pro	Arg	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Pro	Leu	Ala	Asn	Gly
		290				295					300					
	Arg	Ala	Gly	Lys	Arg	Arg	Pro	Ser	Arg	Leu	Val	Ala	Leu	Arg	Glu	Gln
	305					310					315				320	
	Lys	Ala	Leu	Lys	Thr	Leu	Gly	Ile	Ile	Met	Gly	Val	Phe	Thr	Leu	Cys
				325						330		</				

65 Ala Gly Cys Asn Gly Gly Ala Ala Ala Asp Ser Asp Ser Ser Leu Asp
450 455 460
Glu Pro Cys Arg Pro Gly Phe Ala Ser Glu Ser Lys Val
465 470 475

ES 2 345 993 T3

<210> 3

<211> 1434

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(1434)

<400> 3

15

```
atg ggc gcg ggg gtg ctc gtc ctg ggc gcc tcc gag ccc ggt aac ctg 48
Met Gly Ala Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Ser Glu Pro Gly Asn Leu
1 5 10 15
```

20

```
tcg tcg gcc gca ccg ctc ccc gac ggc gcg gcc acc gcg gcg cgg ctg 96
Ser Ser Ala Ala Pro Leu Pro Asp Gly Ala Ala Thr Ala Ala Arg Leu
20 25 30
```

25

```
ctg gtg ccc gcg tcg ccg ccc gcc tcg ttg ctg cct ccc gcc agc gaa 144
Leu Val Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser Leu Leu Pro Pro Ala Ser Glu
35 40 45
```

30

```
agc ccc gag ccg ctg tct cag cag tgg aca gcg ggc atg ggt ctg ctg 192
Ser Pro Glu Pro Leu Ser Gln Gln Trp Thr Ala Gly Met Gly Leu Leu
50 55 60
```

35

```
atg gcg ctc atc gtg ctg ctc atc gtg gcg ggc aat gtg ctg gtg atc 240
Met Ala Leu Ile Val Leu Leu Ile Val Ala Gly Asn Val Leu Val Ile
65 70 75 80
```

```
gtg gcc atc gcc aag acg ccg cgg ctg cag acg ctc acc aac ctc ttc 288
Val Ala Ile Ala Lys Thr Pro Arg Leu Gln Thr Leu Thr Asn Leu Phe
85 90 95
```

40

```
atc atg tcc ctg gcc agc gcc gac ctg gtc atg ggg ctg ctg gtg gtg 336
Ile Met Ser Leu Ala Ser Ala Asp Leu Val Met Gly Leu Leu Val Val
100 105 110
```

45

```
ccg ttc ggg gcc acc atc gtg gtg tgg ggc cgc tgg gag tac ggc tcc 384
Pro Phe Gly Ala Thr Ile Val Val Trp Gly Arg Trp Glu Tyr Gly Ser
115 120 125
```

50

```
ttc ttc tgc gag ctg tgg aac tca gtg gac gtg ctg tgc gtg acg gcc 432
Phe Phe Cys Glu Leu Trp Thr Ser Val Asp Val Leu Cys Val Thr Ala
130 135 140
```

55

```
agc atc gag acc ctg tgt gtc att gcc ctg gac cgc tac ctc gcc atc 480
Ser Ile Glu Thr Leu Cys Val Ile Ala Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Ile
145 150 155 160
```

60

65

ES 2 345 993 T3

	acc	tcg	ccc	ttc	cgc	tac	cag	agc	ctg	ctg	acg	cgc	gcg	cgg	gcg	cgg	528
	Thr	Ser	Pro	Phe	Arg	Tyr	Gln	Ser	Leu	Leu	Thr	Arg	Ala	Arg	Ala	Arg	
					165					170					175		
5	ggc	ctc	gtg	tgc	acc	gtg	tgg	gcc	atc	tcg	gcc	ctg	gtg	tcc	ttc	ctg	576
	Gly	Leu	Val	Cys	Thr	Val	Trp	Ala	Ile	Ser	Ala	Leu	Val	Ser	Phe	Leu	
				180					185					190			
10	ccc	atc	ctc	atg	cac	tgg	tgg	cgg	gcg	gag	agc	gac	gag	gcg	cgc	cgc	624
	Pro	Ile	Leu	Met	His	Trp	Trp	Arg	Ala	Glu	Ser	Asp	Glu	Ala	Arg	Arg	
			195					200					205				
15	tgc	tac	aac	gac	ccc	aag	tgc	tgc	gac	ttc	gtc	acc	aac	cgg	gcc	tac	672
	Cys	Tyr	Asn	Asp	Pro	Lys	Cys	Cys	Asp	Phe	Val	Thr	Asn	Arg	Ala	Tyr	
		210					215					220					
20	gcc	atc	gcc	tcg	tcc	gta	gtc	tcc	ttc	tac	gtg	ccc	ctg	tgc	atc	atg	720
	Ala	Ile	Ala	Ser	Ser	Val	Val	Ser	Phe	Tyr	Val	Pro	Leu	Cys	Ile	Met	
	225					230					235					240	
25	gcc	ttc	gtg	tac	ctg	cgg	gtg	ttc	cgc	gag	gcc	cag	aag	cag	gtg	aag	768
	Ala	Phe	Val	Tyr	Leu	Arg	Val	Phe	Arg	Glu	Ala	Gln	Lys	Gln	Val	Lys	
					245					250					255		
30	aag	atc	gac	agc	tgc	gag	cgc	cgt	ttc	ctc	ggc	ggc	cca	gcg	cgg	ccg	816
	Lys	Ile	Asp	Ser	Cys	Glu	Arg	Arg	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ala	Arg	Pro	
				260					265					270			
35	ccc	tcg	ccc	tcg	ccc	tcg	ccc	gtc	ccc	gcg	ccc	gcg	ccg	ccg	ccc	gga	864
	Pro	Ser	Pro	Ser	Pro	Ser	Pro	Val	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Pro	Pro	Gly	
			275					280					285				
40	ccc	ccg	cgc	ccc	gcc	gcc	gcc	gcc	acc	gcc	ccg	ctg	gcc	aac	ggg		912
	Pro	Pro	Arg	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Pro	Leu	Ala	Asn	Gly		
		290				295					300						
45	cgt	gcg	ggt	aag	cgg	cgg	ccc	tcg	cgc	ctc	gtg	gcc	ctg	cgc	gag	cag	960
	Arg	Ala	Gly	Lys	Arg	Arg	Pro	Ser	Arg	Leu	Val	Ala	Leu	Arg	Glu	Gln	
	305				310					315					320		
50	aag	gcg	ctc	aag	acg	ctg	ggc	atc	atc	atg	ggc	gtc	ttc	acg	ctc	tgc	1008
	Lys	Ala	Leu	Lys	Thr	Leu	Gly	Ile	Ile	Met	Gly	Val	Phe	Thr	Leu	Cys	
					325					330					335		
55	tgg	ctg	ccc	ttc	ttc	ctg	gcc	aac	gtg	gtg	aag	gcc	ttc	cac	cgc	gag	1056
	Trp	Leu	Pro	Phe	Phe	Leu	Ala	Asn	Val	Val	Lys	Ala	Phe	His	Arg	Glu	
				340				345						350			
60	ctg	gtg	ccc	gac	cgc	ccc	ttc	gtc	ttc	ttc	aac	tgg	ctg	ggc	tac	gcc	1104
	Leu	Val	Pro	Asp	Arg	Leu	Phe	Val	Phe	Phe	Asn	Trp	Leu	Gly	Tyr	Ala	
			355				360					365					
65	aac	tcg	gcc	ttc	aac	ccc	atc	atc	tac	tgc	cgc	agc	ccc	gac	ttc	cgc	1152
	Asn	Ser	Ala	Phe	Asn	Pro	Ile	Ile	Tyr	Cys	Arg	Ser	Pro	Asp	Phe	Arg	
		370				375					380						
	aag	gcc	ttc	cag	cga	ctg	ctc	tgc	tgc	gcg	cgc	agg	gct	gcc	cgc	cgg	1200

ES 2 345 993 T3

Lys Ala Phe Gln Arg Leu Leu Cys Cys Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg
 385 390 395 400
 5 cgc cac gcg acc cac gga gac cgg ccg cgc gcc tcg ggc tgt ctg gcc 1248
 Arg His Ala Thr His Gly Asp Arg Pro Arg Ala Ser Gly Cys Leu Ala
 405 410 415
 10 cgg ccc gga ccc ccg cca tcg ccc ggg gcc gcc tcg gac gac gac gac 1296
 Arg Pro Gly Pro Pro Pro Ser Pro Gly Ala Ala Ser Asp Asp Asp Asp
 420 425 430
 15 gac gat gtc gtc ggg gcc acg ccg ccc gcg cgc ctg ctg gag ccc tgg 1344
 Asp Asp Val Val Gly Ala Thr Pro Pro Ala Arg Leu Leu Glu Pro Trp
 435 440 445
 20 gcc ggc tgc aac ggc ggg gcg gcg gcg gac agc gac tcg agc ctg gac 1392
 Ala Gly Cys Asn Gly Gly Ala Ala Ala Asp Ser Asp Ser Ser Leu Asp
 450 455 460
 gag ccg tgc cgc ccc ggc ttc gcc tcg gaa tcc aag gtg tag 1434
 Glu Pro Cys Arg Pro Gly Phe Ala Ser Glu Ser Lys Val
 465 470 475
 25
 <210> 4
 <211> 477
 30 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4
 35
 Met Gly Ala Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Ser Glu Pro Gly Asn Leu
 1 5 10 15
 40 Ser Ser Ala Ala Pro Leu Pro Asp Gly Ala Ala Thr Ala Ala Arg Leu
 20 25 30
 Leu Val Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser Leu Leu Pro Pro Ala Ser Glu
 35 40 45
 Ser Pro Glu Pro Leu Ser Gln Trp Thr Ala Gly Met Gly Leu Leu
 50 55 60
 45 Met Ala Leu Ile Val Leu Leu Ile Val Ala Gly Asn Val Leu Val Ile
 65 70 75 80
 Val Ala Ile Ala Lys Thr Pro Arg Leu Gln Thr Leu Thr Asn Leu Phe
 85 90 95
 50 Ile Met Ser Leu Ala Ser Ala Asp Leu Val Met Gly Leu Leu Val Val
 100 105 110
 Pro Phe Gly Ala Thr Ile Val Val Trp Gly Arg Trp Glu Tyr Gly Ser
 115 120 125
 55 Phe Phe Cys Glu Leu Trp Thr Ser Val Asp Val Leu Cys Val Thr Ala
 130 135 140
 Ser Ile Glu Thr Leu Cys Val Ile Ala Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Ile
 145 150 155 160
 Thr Ser Pro Phe Arg Tyr Gln Ser Leu Leu Thr Arg Ala Arg Ala Arg
 165 170 175
 60 Gly Leu Val Cys Thr Val Trp Ala Ile Ser Ala Leu Val Ser Phe Leu
 180 185 190
 Pro Ile Leu Met His Trp Trp Arg Ala Glu Ser Asp Glu Ala Arg Arg
 195 200 205
 65 Cys Tyr Asn Asp Pro Lys Cys Cys Asp Phe Val Thr Asn Arg Ala Tyr

ES 2 345 993 T3

	210		215		220	
	Ala Ile Ala Ser Ser Val Val Ser Phe Tyr Val Pro Leu Cys Ile Met					
	225		230		235	240
5	Ala Phe Val Tyr Leu Arg Val Phe Arg Glu Ala Gln Lys Gln Val Lys					
		245		250		255
	Lys Ile Asp Ser Cys Glu Arg Arg Phe Leu Gly Gly Pro Ala Arg Pro					
		260		265		270
10	Pro Ser Pro Ser Pro Ser Pro Val Pro Ala Pro Ala Pro Pro Pro Gly					
		275		280		285
	Pro Pro Arg Pro Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Pro Leu Ala Asn Gly					
		290		295		300
	Arg Ala Gly Lys Arg Arg Pro Ser Arg Leu Val Ala Leu Arg Glu Gln					
	305		310		315	320
15	Lys Ala Leu Lys Thr Leu Gly Ile Ile Met Gly Val Phe Thr Leu Cys					
		325		330		335
	Trp Leu Pro Phe Phe Leu Ala Asn Val Val Lys Ala Phe His Arg Glu					
		340		345		350
20	Leu Val Pro Asp Arg Leu Phe Val Phe Phe Asn Trp Leu Gly Tyr Ala					
		355		360		365
	Asn Ser Ala Phe Asn Pro Ile Ile Tyr Cys Arg Ser Pro Asp Phe Arg					
		370		375		380
	Lys Ala Phe Gln Arg Leu Leu Cys Cys Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg					
	385		390		395	400
25	Arg His Ala Thr His Gly Asp Arg Pro Arg Ala Ser Gly Cys Leu Ala					
		405		410		415
	Arg Pro Gly Pro Pro Pro Ser Pro Gly Ala Ala Ser Asp Asp Asp Asp					
		420		425		430
30	Asp Asp Val Val Gly Ala Thr Pro Pro Ala Arg Leu Leu Glu Pro Trp					
		435		440		445
	Ala Gly Cys Asn Gly Gly Ala Ala Ala Asp Ser Asp Ser Ser Leu Asp					
		450		455		460
	Glu Pro Cys Arg Pro Gly Phe Ala Ser Glu Ser Lys Val					
35	465		470		475	

40 <210> 5
 <211> 1958
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 45 <220>
 <221> CDS
 <222> (39)..(1427)
 50 <400> 5

55	ccggctccag gagggacggc gtagctcgcg ggaggacc atg gcg tcc ccg gcg ctg 56	
		Met Ala Ser Pro Ala Leu
		1 5
60	gcg gcg gcg ctg gcg gtg gcg gca gcg gcg ggc ccc aat gcg agc ggc 104	
	Ala Ala Ala Leu Ala Val Ala Ala Ala Ala Gly Pro Asn Ala Ser Gly	
		10 15 20
65	gcg ggc gag agg ggc agc ggc ggg gtt gcc aat gcc tcg ggg gct tcc 152	
	Ala Gly Glu Arg Gly Ser Gly Gly Val Ala Asn Ala Ser Gly Ala Ser	
		25 30 35

ES 2 345 993 T3

5	tgg ggg ccg ccg cgc ggc cag tac tcg gcg ggc gcg gtg gca ggg ctg Trp Gly Pro Pro Arg Gly Gln Tyr Ser Ala Gly Ala Val Ala Gly Leu 40 45 50	200
10	gct gcc gtg gtg ggc ttc ctc atc gtc ttc acc gtg gtg ggc aac gtg Ala Ala Val Val Gly Phe Leu Ile Val Phe Thr Val Val Gly Asn Val 55 60 65 70	248
15	ctg gtg gtg atc gcc gtg ctg acc agc cgg gcg ctg cgc gcg cca cag Leu Val Val Ile Ala Val Leu Thr Ser Arg Ala Leu Arg Ala Pro Gln 75 80 85	296
20	aac ctc ttc ctg gtg tcg ctg gcc tcg gcc gac atc ctg gtg gcc acg Asn Leu Phe Leu Val Ser Leu Ala Ser Ala Asp Ile Leu Val Ala Thr 90 95 100	344
25	ctg gtc atg ccc ttc tcg ttg gcc aac gag ctc atg gcc tac tgg tac Leu Val Met Pro Phe Ser Leu Ala Asn Glu Leu Met Ala Tyr Trp Tyr 105 110 115	392
30	ttc ggg cag gtg tgg tgc ggc gtg tac ctg gcg ctc gat gtg ctg ttt Phe Gly Gln Val Trp Cys Gly Val Tyr Leu Ala Leu Asp Val Leu Phe 120 125 130	440
35	tgc acc tcg tcg atc gtg cat ctg tgt gcc atc agc ctg gac cgc tac Cys Thr Ser Ser Ile Val His Leu Cys Ala Ile Ser Leu Asp Arg Tyr 135 140 145 150	488
40	tgg tcg gtg acg cag gcc gtc gag tac aac ctg aag cgc aca cca cgc Trp Ser Val Thr Gln Ala Val Glu Tyr Asn Leu Lys Arg Thr Pro Arg 155 160 165	536
45	cgc gtc aag gcc acc atc gtg gcc gtg tgg ctc atc tcg gcc gtc atc Arg Val Lys Ala Thr Ile Val Ala Val Trp Leu Ile Ser Ala Val Ile 170 175 180	584
50	tcc ttc ccg ccg ctg gtc tcg ctc tac cgc cag ccc gac ggc gcc gcc Ser Phe Pro Pro Leu Val Ser Leu Tyr Arg Gln Pro Asp Gly Ala Ala 185 190 195	632
55	tac ccg cag tgc ggc ctc aac gac gag acc tgg tac atc ctg tcc tcc Tyr Pro Gln Cys Gly Leu Asn Asp Glu Thr Trp Tyr Ile Leu Ser Ser 200 205 210	680
60	tgc atc ggc tcc ttc ttc gcg ccc tgc ctc atc atg ggc ctg gtc tac Cys Ile Gly Ser Phe Phe Ala Pro Cys Leu Ile Met Gly Leu Val Tyr 215 220 225 230	728
65	gcg cgc atc tac cga gtg gcc aag ctg cgc acg cgc acg ctc agc gag Ala Arg Ile Tyr Arg Val Ala Lys Leu Arg Thr Arg Thr Leu Ser Glu 235 240 245	776
	aag cgc gcc ccc gtg ggc ccc gac ggt gcg tcc ccg act acc gaa aac Lys Arg Ala Pro Val Gly Pro Asp Gly Ala Ser Pro Thr Thr Glu Asn 250 255 260	824

ES 2 345 993 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

ggg ctg ggc gcg gcg gca ggc gca ggc gag aac ggg cac tgc gcg ccc 872
 Gly Leu Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Glu Asn Gly His Cys Ala Pro
 265 270 275
 ccg ccc gcc gac gtg gag ccg gac gag agc agc gca gcg gcc gag agg 920
 Pro Pro Ala Asp Val Glu Pro Asp Glu Ser Ser Ala Ala Ala Glu Arg
 280 285 290
 cgg cgg cgc cgg ggc gcg ttg cgg cgg ggc ggg cgg cgg cga gcg ggc 968
 Arg Arg Arg Arg Gly Ala Leu Arg Arg Gly Gly Arg Arg Arg Ala Gly
 295 300 305 310
 gcg gag ggg ggc gcg ggc ggt gcg gac ggg cag ggg gcg ggg ccg ggg 1016
 Ala Glu Gly Gly Ala Gly Gly Ala Asp Gly Gln Gly Ala Gly Pro Gly
 315 320 325
 gcg gct gag tgc ggg gcg ctg acc gcc tcc agg tcc ccg ggg ccc ggt 1064
 Ala Ala Glu Ser Gly Ala Leu Thr Ala Ser Arg Ser Pro Gly Pro Gly
 330 335 340
 ggc cgc ctg tgc cgc gcc agc tgc cgc tcc gtc gag ttc ttc ctg tgc 1112
 Gly Arg Leu Ser Arg Ala Ser Ser Arg Ser Val Glu Phe Phe Leu Ser
 345 350 355
 cgc cgg cgc cgg gcg cgc agc agc gtg tgc cgc cgc aag gtg gcc cag 1160
 Arg Arg Arg Arg Ala Arg Ser Ser Val Cys Arg Arg Lys Val Ala Gln
 360 365 370
 gcg cgc gag aag cgc ttc acc ttt gtg ctg gct gtg gtc atg ggc gtg 1208
 Ala Arg Glu Lys Arg Phe Thr Phe Val Leu Ala Val Val Met Gly Val
 375 380 385 390
 ttc gtg ctc tgc tgg ttc ccc ttc ttc ttc agc tac agc ctg tac ggc 1256
 Phe Val Leu Cys Trp Phe Pro Phe Phe Phe Ser Tyr Ser Leu Tyr Gly
 395 400 405
 atc tgc cgc gag gcc tgc cag gtg ccc ggc ccg ctc ttc aag ttc ttc 1304
 Ile Cys Arg Glu Ala Cys Gln Val Pro Gly Pro Leu Phe Lys Phe Phe
 410 415 420
 ttc tgg atc ggc tac tgc aac agc tgc ctc aac ccg gtc atc tac acg 1352
 Phe Trp Ile Gly Tyr Cys Asn Ser Ser Leu Asn Pro Val Ile Tyr Thr
 425 430 435
 gtc ttc aac cag gat ttc cgg cga tcc ttt aag cac atc ctc ttc cga 1400
 Val Phe Asn Gln Asp Phe Arg Arg Ser Phe Lys His Ile Leu Phe Arg
 440 445 450
 cgg agg aga agc ggc ttc cgg cag tga ctgcaccccg tctgggaatc 1447
 Arg Arg Arg Arg Gly Phe Arg Gln
 455 460
 ctggacagct ccgcgctcgg ggctgggcag aaggggcggc ccggacgggg gagctttccc 1507
 agagaccggg ggatggattg gcctccaggg cgcaggggag ggtgcggcag ggcaggagct 1567
 tggcagagag atagccgggc tccagggagt ggggaggaga gagggggaga cccttttgcc 1627

ES 2 345 993 T3

ttccccctc agcaaggggc tgcttctggg gtcctctgcc tggatccagc tctggggagcc 1687
 ctgccgaggt gtggctgtga ggtcagggtt ttagagagca gtggcagagg tagcccccta 1747
 5 aatgggcaag caaggagccc cccaaagaca ctaccactcc ccatccccgt ctgaccaagg 1807
 gctgacttct ccaggaccta gtcgggggggt ggctgccagg gggcaaggag aaagcaccga 1867
 10 caatctttga ttactgaaag tattttaaatg tttgccaaaa acaacagcca aaacaaccaa 1927
 actattttct aaataaacct ttgtaatcta a 1958

<210> 6

<211> 462

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

Met	Ala	Ser	Pro	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala	Val	Ala	Ala	Ala	Ala
1				5					10				15		
Gly	Pro	Asn	Ala	Ser	Gly	Ala	Gly	Glu	Arg	Gly	Ser	Gly	Gly	Val	Ala
			20					25					30		
Asn	Ala	Ser	Gly	Ala	Ser	Trp	Gly	Pro	Pro	Arg	Gly	Gln	Tyr	Ser	Ala
			35				40					45			
Gly	Ala	Val	Ala	Gly	Leu	Ala	Ala	Val	Val	Gly	Phe	Leu	Ile	Val	Phe
			50			55				60					
Thr	Val	Val	Gly	Asn	Val	Leu	Val	Val	Ile	Ala	Val	Leu	Thr	Ser	Arg
			65		70				75					80	
Ala	Leu	Arg	Ala	Pro	Gln	Asn	Leu	Phe	Leu	Val	Ser	Leu	Ala	Ser	Ala
				85				90					95		
Asp	Ile	Leu	Val	Ala	Thr	Leu	Val	Met	Pro	Phe	Ser	Leu	Ala	Asn	Glu
			100					105				110			
Leu	Met	Ala	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Gly	Gln	Val	Trp	Cys	Gly	Val	Tyr	Leu
		115					120					125			
Ala	Leu	Asp	Val	Leu	Phe	Cys	Thr	Ser	Ser	Ile	Val	His	Leu	Cys	Ala
			130			135				140					
Ile	Ser	Leu	Asp	Arg	Tyr	Trp	Ser	Val	Thr	Gln	Ala	Val	Glu	Tyr	Asn
			145		150					155				160	
Leu	Lys	Arg	Thr	Pro	Arg	Arg	Val	Lys	Ala	Thr	Ile	Val	Ala	Val	Trp
				165				170					175		
Leu	Ile	Ser	Ala	Val	Ile	Ser	Phe	Pro	Pro	Leu	Val	Ser	Leu	Tyr	Arg
			180					185				190			
Gln	Pro	Asp	Gly	Ala	Ala	Tyr	Pro	Gln	Cys	Gly	Leu	Asn	Asp	Glu	Thr
		195					200					205			
Trp	Tyr	Ile	Leu	Ser	Ser	Cys	Ile	Gly	Ser	Phe	Phe	Ala	Pro	Cys	Leu
		210				215				220					
Ile	Met	Gly	Ile	Val	Tyr	Ala	Arg	Ile	Tyr	Arg	Val	Asn	Lys	Leu	Arg
		225				230				235				240	
Thr	Arg	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Arg	Ala	Pro	Val	Gly	Pro	Asp	Gly	Ala
				245				250					255		
Ser	Pro	Thr	Thr	Glu	Asn	Gly	Leu	Gly	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Gly	Glu
			260				265					270			
Asn	Gly	His	Cys	Ala	Pro	Pro	Pro	Ala	Asp	Val	Glu	Pro	Asp	Glu	Ser
			275				280				285				
Ser	Ala	Ala	Ala	Glu	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Gly	Ala	Leu	Arg	Arg	Gly

ES 2 345 993 T3

```

      290              295              300
Gly Arg Arg Arg Ala Gly Ala Glu Gly Gly Ala Gly Gly Ala Asp Gly
305              310              315              320
5  Gln Gly Ala Gly Pro Gly Ala Ala Glu Ser Gly Ala Leu Thr Ala Ser
      325              330              335
Arg Ser Pro Gly Pro Gly Gly Arg Leu Ser Arg Ala Ser Ser Arg Ser
      340              345              350
Val Glu Phe Phe Leu Ser Arg Arg Arg Ala Arg Ser Ser Val Cys
      355              360              365
10 Arg Arg Lys Val Ala Gln Ala Arg Glu Lys Arg Phe Thr Phe Val Leu
      370              375              380
Ala Val Val Met Gly Val Phe Val Leu Cys Trp Phe Pro Phe Phe Phe
385              390              395              400
15 Ser Tyr Ser Leu Tyr Gly Ile Cys Arg Glu Ala Cys Gln Val Pro Gly
      405              410              415
Pro Leu Phe Lys Phe Phe Phe Trp Ile Gly Tyr Cys Asn Ser Ser Leu
      420              425              430
Asn Pro Val Ile Tyr Thr Val Phe Asn Gln Asp Phe Arg Arg Ser Phe
      435              440              445
20 Lys His Ile Leu Phe Arg Arg Arg Arg Gly Phe Arg Gln
      450              455              460

25 <210> 7
    <211> 1377
    <212> ADN
30  <213> Homo sapiens

    <220>
    <221> CDS
35  <222> (1)..(1377)

    <400> 7

40
    atg gcg tcc ccg gcg ctg gcg gcg gcg ctg gcg gtg gcg gca gcg gcg   48
    Met Ala Ser Pro Ala Leu Ala Ala Ala Leu Ala Val Ala Ala Ala Ala
      1              5              10              15

45
    ggc ccc aat gcg agc ggc gcg ggc gag agg ggc agc ggc ggg gtt gcc   96
    Gly Pro Asn Ala Ser Gly Ala Gly Glu Arg Gly Ser Gly Gly Val Ala
      20              25              30

50
    aat gcc tcg ggg gct tcc tgg ggg ccg ccg cgc ggc cag tac tcg gcg   144
    Asn Ala Ser Gly Ala Ser Trp Gly Pro Pro Arg Gly Gln Tyr Ser Ala
      35              40              45

55
    ggc gcg gtg gca ggg ctg gct gcc gtg gtg ggc ttc ctc atc gtc ttc   192
    Gly Ala Val Ala Gly Leu Ala Ala Val Val Gly Phe Leu Ile Val Phe
      50              55              60

60
    acc gtg gtg ggc aac gtg ctg gtg gtg atc gcc gtg ctg acc agc cgg   240
    Thr Val Val Gly Asn Val Leu Val Val Ile Ala Val Leu Thr Ser Arg
      65              70              75              80

65
    gcg ctg cgc gcg cca cag aac ctc ttc ctg gtg tcg ctg gcc tcg gcc   288
    Ala Leu Arg Ala Pro Gln Asn Leu Phe Leu Val Ser Leu Ala Ser Ala
      85              90              95

```

ES 2 345 993 T3

	gac atc ctg gtg gcc acg ctg gtc atg ccc ttc tcg ttg gcc aac gag	336
	Asp Ile Leu Val Ala Thr Leu Val Met Pro Phe Ser Leu Ala Asn Glu	
	100 105 110	
5	ctc atg gcc tac tgg tac ttc ggg cag gtg tgg tgc ggc gtg tac ctg	384
	Leu Met Ala Tyr Trp Tyr Phe Gly Gln Val Trp Cys Gly Val Tyr Leu	
	115 120 125	
10	gcg ctc gat gtg ctg ttt tgc acc tcg tcg atc gtg cat ctg tgt gcc	432
	Ala Leu Asp Val Leu Phe Cys Thr Ser Ser Ile Val His Leu Cys Ala	
	130 135 140	
15	atc agc ctg gac cgc tac tgg tcg gtg acg cag gcc gtc gag tac aac	480
	Ile Ser Leu Asp Arg Tyr Trp Ser Val Thr Gln Ala Val Glu Tyr Asn	
	145 150 155 160	
20	ctg aag cgc aca cca cgc cgc gtc aag gcc acc atc gtc gcc gtg tgg	528
	Leu Lys Arg Thr Pro Arg Arg Val Lys Ala Thr Ile Val Ala Val Trp	
	165 170 175	
25	ctc atc tcg gcc gtc atc tcc ttc ccg ccg ctg gtc tcg ctc tac cgc	576
	Leu Ile Ser Ala Val Ile Ser Phe Pro Pro Leu Val Ser Leu Tyr Arg	
	180 185 190	
30	cag ccc gac ggc gcc gcc tac ccg cag tgc ggc ctc aac gac gag acc	624
	Gln Pro Asp Gly Ala Ala Tyr Pro Gln Cys Gly Leu Asn Asp Glu Thr	
	195 200 205	
35	tgg tac atc ctg tcc tcc tgc atc ggc tcc ttc ttc gcg ccc tgc ctc	672
	Trp Tyr Ile Leu Ser Ser Cys Ile Gly Ser Phe Phe Ala Pro Cys Leu	
	210 215 220	
40	atc atg ggc ctg gtc tac gcg cgc atc tac cga gtg gcc aag ctg cgc	720
	Ile Met Gly Leu Val Tyr Ala Arg Ile Tyr Arg Val Ala Lys Leu Arg	
	225 230 235 240	
45	acg cgc acg ctc agc gag aag cgc gcc ccc gtg ggc ccc gac ggt gcg	768
	Thr Arg Thr Leu Ser Glu Lys Arg Ala Pro Val Gly Pro Asp Gly Ala	
	245 250 255	
50	tcc ccg act acc gaa aac ggg ctg ggc gcg gcg gca ggc gca ggc gag	816
	Ser Pro Thr Thr Glu Asn Gly Leu Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Glu	
	260 265 270	
55	aac ggg cac tgc gcg ccc ccg ccc gcc gac gtg gag ccg gac gag agc	864
	Asn Gly His Cys Ala Pro Pro Pro Ala Asp Val Glu Pro Asp Glu Ser	
	275 280 285	
60	agc gca gcg gcc gag agg cgg cgg cgc cgg ggc gcg ttg cgg cgg ggc	912
	Ser Ala Ala Ala Glu Arg Arg Arg Arg Gly Ala Leu Arg Arg Gly	
	290 295 300	
65	ggg cgg cgg cga gcg ggc gcg gag ggg ggc gcg ggc ggt gcg gac ggg	960
	Gly Arg Arg Arg Ala Gly Ala Glu Gly Gly Ala Gly Gly Ala Asp Gly	
	305 310 315 320	

ES 2 345 993 T3

5 cag ggg gcg gct gag tcg ggg gcg ctg acc gcc tcc agg tcc ccg ggg 1008
 Gln Gly Ala Ala Glu Ser Gly Ala Leu Thr Ala Ser Arg Ser Pro Gly
 325 330 335
 10 ccc ggt ggc cgc ctc tcg cgc gcc agc tcg cgc tcc gtc gag ttc ttc 1056
 Pro Gly Gly Arg Leu Ser Arg Ala Ser Ser Arg Ser Val Glu Phe Phe
 340 345 350
 15 ctg tcg cgc cgg cgc cgg gcg cgc agc agc gtg tgc cgc cgc aag gtg 1104
 Leu Ser Arg Arg Arg Arg Ala Arg Ser Ser Val Cys Arg Arg Lys Val
 355 360 365
 20 gcc cag gcg cgc gag aag cgc ttc acc ttt gtg ctg gct gtg gtc atg 1152
 Ala Gln Ala Arg Glu Lys Arg Phe Thr Phe Val Leu Ala Val Val Met
 370 375 380
 25 ggc gtg ttc gtg ctc tgc tgg ttc ccc ttc ttc ttc agc tac agc ctg 1200
 Gly Val Phe Val Leu Cys Trp Phe Pro Phe Phe Phe Ser Tyr Ser Leu
 385 390 395 400
 30 tac ggc atc tgc cgc gag gcc tgc cag gtg ccc ggc ccg ctc ttc aag 1248
 Tyr Gly Ile Cys Arg Glu Ala Cys Gln Val Pro Gly Pro Leu Phe Lys
 405 410 415
 35 ttc ttc ttc tgg atc ggc tac tgc aac agc tcg ctc aac ccg gtc atc 1296
 Phe Phe Phe Trp Ile Gly Tyr Cys Asn Ser Ser Leu Asn Pro Val Ile
 420 425 430
 40 tac acg gtc ttc aac cag gat ttc cgg cga tcc ttt aag cac atc ctc 1344
 Tyr Thr Val Phe Asn Gln Asp Phe Arg Arg Ser Phe Lys His Ile Leu
 435 440 445
 45 ttc cga cgg agg aga agg ggc ttc agg cag tga 1377
 Phe Arg Arg Arg Arg Arg Gly Phe Arg Gln
 450 455

50 <210> 8
 <211> 458
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 45 <400> 8

50 Met Ala Ser Pro Ala Leu Ala Ala Ala Leu Ala Val Ala Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Gly Pro Asn Ala Ser Gly Ala Gly Glu Arg Gly Ser Gly Gly Val Ala
 20 25 30
 Asn Ala Ser Gly Ala Ser Trp Gly Pro Pro Arg Gly Gln Tyr Ser Ala
 35 40 45
 55 Gly Ala Val Ala Gly Leu Ala Ala Val Val Gly Phe Leu Ile Val Phe
 50 55 60
 Thr Val Val Gly Asn Val Leu Val Val Ile Ala Val Leu Thr Ser Arg
 65 70 75 80
 60 Ala Leu Arg Ala Pro Gln Asn Leu Phe Leu Val Ser Leu Ala Ser Ala
 85 90 95
 Asp Ile Leu Val Ala Thr Leu Val Met Pro Phe Ser Leu Ala Asn Glu
 100 105 110

65

ES 2 345 993 T3

	Leu	Met	Ala	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Gly	Gln	Val	Trp	Cys	Gly	Val	Tyr	Leu
			115					120					125			
	Ala	Leu	Asp	Val	Leu	Phe	Cys	Thr	Ser	Ser	Ile	Val	His	Leu	Cys	Ala
5		130					135					140				
	Ile	Ser	Leu	Asp	Arg	Tyr	Trp	Ser	Val	Thr	Gln	Ala	Val	Glu	Tyr	Asn
	145					150					155					160
	Leu	Lys	Arg	Thr	Pro	Arg	Arg	Val	Lys	Ala	Thr	Ile	Val	Ala	Val	Trp
					165					170						175
10	Leu	Ile	Ser	Ala	Val	Ile	Ser	Phe	Pro	Pro	Leu	Val	Ser	Leu	Tyr	Arg
					180				185							190
	Gln	Pro	Asp	Gly	Ala	Ala	Tyr	Pro	Gln	Cys	Gly	Leu	Asn	Asp	Glu	Thr
			195					200					205			
	Trp	Tyr	Ile	Leu	Ser	Ser	Cys	Ile	Gly	Ser	Phe	Phe	Ala	Pro	Cys	Leu
15		210					215						220			
	Ile	Met	Gly	Leu	Val	Tyr	Ala	Arg	Ile	Tyr	Arg	Val	Ala	Lys	Leu	Arg
	225					230					235					240
	Thr	Arg	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Arg	Ala	Pro	Val	Gly	Pro	Asp	Gly	Ala
					245					250					255	
20	Ser	Pro	Thr	Thr	Glu	Asn	Gly	Leu	Gly	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Gly	Glu
					260				265						270	
	Asn	Gly	His	Cys	Ala	Pro	Pro	Pro	Ala	Asp	Val	Glu	Pro	Asp	Glu	Ser
			275					280					285			
	Ser	Ala	Ala	Ala	Glu	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Gly	Ala	Leu	Arg	Arg	Gly
25		290					295					300				
	Gly	Arg	Arg	Arg	Ala	Gly	Ala	Glu	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Asp	Gly
	305					310					315					320
	Gln	Gly	Ala	Ala	Glu	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ala	Ser	Arg	Ser	Pro	Gly
					325					330					335	
30	Pro	Gly	Gly	Arg	Leu	Ser	Arg	Ala	Ser	Ser	Arg	Ser	Val	Glu	Phe	Phe
					340				345					350		
	Leu	Ser	Arg	Arg	Arg	Ala	Arg	Ser	Ser	Val	Cys	Arg	Arg	Lys	Val	
			355				360					365				
	Ala	Gln	Ala	Arg	Glu	Lys	Arg	Phe	Thr	Phe	Val	Leu	Ala	Val	Val	Met
35		370					375					380				
	Gly	Val	Phe	Val	Leu	Cys	Trp	Phe	Pro	Phe	Phe	Phe	Ser	Tyr	Ser	Leu
	385					390					395					400
	Tyr	Gly	Ile	Cys	Arg	Glu	Ala	Cys	Gln	Val	Pro	Gly	Pro	Leu	Phe	Lys
				405						410					415	
40	Phe	Phe	Phe	Trp	Ile	Gly	Tyr	Cys	Asn	Ser	Ser	Leu	Asn	Pro	Val	Ile
				420					425					430		
	Tyr	Thr	Val	Phe	Asn	Gln	Asp	Phe	Arg	Arg	Ser	Phe	Lys	His	Ile	Leu
			435					440					445			
45	Phe	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Gly	Phe	Arg	Gln						
	450						455									