



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 31 970 T2** 2008.12.11

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 290 220 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 31 970.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US01/12087**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 926 956.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/079554**

(86) PCT-Anmeldetag: **13.04.2001**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **25.10.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.03.2003**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **19.12.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **11.12.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/68** (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

196916 P 13.04.2000 US

(73) Patentinhaber:

Georgetown University, Washington, D.C., US

(74) Vertreter:

**Keil & Schaaflhausen Patentanwälte, 60322
Frankfurt**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:

**WOOSLEY, Raymond L., North Arlington, VA
22207, US**

(54) Bezeichnung: **GENETISCHE DIAGNOSE ZUR FESTSTELLUNG VON QT-VERLÄNGERUNGEN ALS UNER-
WÜNSCHTE REAKTION AUF ARZNEIMITTEL**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf Verfahren zum Feststellen einer Neigung für QT-Intervallverlängerung bei einer Person nach der Verabreichung eines pharmazeutischen Wirkstoffs oder Wirkstoffen. Zusammensetzungen und Kits zum Feststellen dieser Neigungen für QT-Intervallverlängerungen werden ebenfalls beschrieben.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Screenen einer Person auf eine Neigung zu einer unerwünschten Reaktion auf Arzneimittel einhergehend mit verlängerten QT-Intervallen. Das genetische Screenen von Patienten auf diese Neigung konzentriert sich auf mit QT-Intervallverlängerung verbundene Gene umfassend LQT-Gene, P-Glycoprotein-Membranpumpe-Proteine (P-gp), Multiarzneimittel resistente Gene und Cytochrom-P450-vermittelte Arzneimittel-metabolismus-Gene.

I. LQT und Cytochrom-P450-Gene und Polymorphismen**1. LQT-Gene**

[0003] Gene, verbunden mit dem long QT(LQT)-Syndrom (LQTS) umfassen KVLQT1 (LQT1), HERG (LQT2), SCN5A (LQT3) und MinK (LQT5). Ein fünfter Genort ist auf dem menschlichen Chromosom 4 (z. B. LQT4) vorhanden. Kürzlich ist ein sechstes Gen (LQT6) identifiziert worden (Wang et al., Ann. Med. 30: 58–65 (1998)). Alle außer LQT3 kodieren die kardialen Kaliumionen(K⁺)kanal-Proteine; LQT3 kodiert ein kardiales Natriumionen(Na⁺)kanal-Protein (Vincent, Annu. Rev. Med. 49: 263–74 (1998)). Mindestens 180 Mutationen wurden innerhalb dieser Gene identifiziert (Abbott et al., Cell 97: 175–87 (1999); Vincent, Annu. Rev. Med. 49: 263–74 (1998); Curran et al., Cell 80: 795–803 (1995); Berthet et al., Circulation 99: 1464–70 (1999); Dausse et al., J. Mol. Cell Cardiol. 28: 1609–15 (1996); Chen et al., J. Biol. Chem. 274: 10113–8 (1999) und Sanguinetti et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 2208–12 (1996)). Einige dieser Mutationen verursachen eine geänderte Ionenkanalfunktion, welche zu nicht durch Arzneimittel induzierten verlängerten QT-Intervallen und einer Neigung zu Torsades de Pointes (TdP) führt (siehe, z. B., Berthet et al., Circulation 99: 1464–70 (1999)). Dementsprechend kann das genetische Screenen an Personen vollzogen werden, welche unter Verdacht stehen, das long QT-Syndrom zu haben, ebenso wie an anderen Patienten (siehe, z. B., Satler et al., Hum. Genet. 102: 265–72 (1998)). Larson et al., Hum. Mutat. 13: 318–27 (1999) berichtete über eine hochdurchgängige Einzelstrangpolymorphismus (SSCP)-Analyse für die Erkennung von mit LQTS verbundenen Punktmutationen.

[0004] Das US-Patent Nr. 5,599,673 beansprucht zwei (z. B. HERG und SCN5A) der sechs LQT-Gene. Zwei HERG-bezogene Gene wurden ebenfalls beansprucht (US-Patent Nr. 5,986,081). Die internationale PCT-Anmeldung WO 97/23598 beschreibt ein Verfahren zur Bewertung eines Patientenrisikos für das long QT-Syndrom (LQTS) durch Screenen nach genetischen Mutationen in dem MinK-Gen. Allerdings offenbaren diese Patente keine Verfahren zur Diagnose der Neigung eines Patienten zu einer unerwünschten Reaktion auf Arzneimittel einhergehend mit einer Verlängerung des QT-Intervalls aufgrund von Mutationen in irgendeinem der LQT-Gene.

[0005] Arzneimittel wurden identifiziert, die eine QT-Intervallverlängerung und dabei unerwünschte Reaktionen auf Arzneimittel hervorrufen. Bestimmte Antihistaminika, wie Terfenadin (z. B. Seldane[®]) und Astemizol (z. B. Hismanal[®]) hemmen wie berichtet die Kaliumkanäle (Woosley, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36: 233–52 (1996)) und inhibieren das HERG-Protein und wurden dadurch postuliert, Torsades de Pointes hervorzurufen (Wang et al., 1998). Alle antiarrhythmischen Arzneimittel, die die Repolarisierung verlängern, können wie berichtet Torsades de Pointes verursachen (Drici et al., Circulation 94: 1471–4 (1996)). Zusätzlich wurden nicht-kardiale und kardiale Arzneimittel, welche geeignet sind, QT-Verlängerungen hervorzurufen, einschließlich vieler, die vom Erfinder identifiziert wurden, am 27. März 1998 auf der folgenden Webseite freigegeben: www.qtdrugs.org. Dennoch konnten Wei et al., Circulation 92: I-125 (1995) HERG oder SCN5A-Genmutationen nicht identifizieren, die mit erworbenen LQTS in mit einem antiarrhythmischen Wirkstoff behandelten Patienten verbunden waren. Nach bestem Wissen des Erfinders hat niemand beschrieben, eine Neigung zu einer unerwünschten Reaktion auf Arzneimittel oder eine unerwünschte Arzneimittel-Arzneimittel-Reaktion, welche QT-Intervallausdehnungen hervorrufen, durch Screenen von Patienten auf einen oder mehrere Polymorphismen in einem oder mehreren LQT-Gen(en) zu diagnostizieren.

1. Cytochrom-P450-Gene

[0006] Die Cytochrom-P450-Enzyme sind ebenfalls mit unerwünschten Reaktionen auf Arzneimittel verbunden. CYP2D6 war das erste Cytochrom-P450-Isoform, welches in seiner Aufteilung als genetisch polymorph erkannt wurde (Eichelbaum et al., Eur. J. Clin. Pharmacol. 16: 183–7 (1979); und Mahgoub et al., Lancet 2: 584–6 (1977)) und es ist nun klar, dass dieses Enzym eine Vielzahl von Arzneimitteln metabolisiert (Inaba et al., Can. J. Physiol. Pharmacol. 73: 331–8 (1995) und Buchert et al., Pharmacogenetics 2: 2–11 (1992)). Mindestens 30 Mutationen existieren, welche die Aktivität und die spezifische Wirksamkeit von CYP2D6 verändern (Jordan et al., Endocr. Rev. 20: 253–78 (1999)). Diese umfassen Allele, die Punktmutationen enthalten, die zu keiner Wirksamkeit führen (z. B. CYP2D6*4), Allele, in denen das CYP2D6-Gen gelöscht wurde (z. B. CYP2D6*5) und Allele, in denen es dupliziert wurde (z. B. CYP2D6*2_n) (Aklillu et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 278: 441–6 (1996)).

[0007] Es gibt eine Vielzahl von Cytochrom-P450-Genen, welche an dem Metabolismus von Arzneimitteln und Arzneimittelmetaboliten beteiligt sind. Mehrere von ihnen umfassen CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5 und CYP3A7. Allelische Variationen existieren unter diesen Genen. Bestimmte dieser allelischen Variationen fusionieren, um einen schlechten Metabolisierer-Phänotyp in 7% der Kaukasier, aber einen geringeren Prozentsatz bei Afrikanern oder Asiaten, und den "sehr schnellen" Phänotyp in ~5% der Kaukasier und mehr als 30% der Afrikaner hervorzurufen. Da ethnischspezifische Allele für beide, Asiaten (Yokoi et al., Pharm. Res. 15: 517–24 (1998)) und Afrikaner (Aklillu et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 278: 441–6 (1996) und Oscarson et al., Mol. Pharmacol. 52: 1034–40 (1997)) identifiziert wurden, die die durchschnittliche Wirksamkeit der Enzyme in diesen Bevölkerungen verändern kann (siehe Tabelle 1 unten), ist es ebenfalls wichtig, diese Allele in Studien über die Beziehung zwischen Genotyp und Phänotyp zu untersuchen.

Tabelle 1

Chromosomverteilung des Cytochrom-P450-Gens					
Chr. 15	Chr. 10 Polymorph	Chr. 10 Polymorph	Chr. 22 Polymorph	Chr. 10	Chr. 7
	3–5% Kaukasische PMs	1–3% Kaukasische PMs	5–10% Kaukasische PMs		
	15–20% Asiatische PMs				

[0008] Tatsächlich wurde aufgrund der metabolischen Unterschiede von Verfahren berichtet, welche ein Arzneimittel, das mit dem CYP2C19-Gen-Produkt, S-Mephenytoin 4'-Hydroxylase, interagiert, identifizieren (US-Patent Nr. 5,786,191).

[0009] Verfahren zum Ermitteln der Anwesenheit oder Abwesenheit von Mutationen in bestimmten Cytochrom-P450-Genen wurden beschrieben. Zum Beispiel bezieht sich das US-Patent Nr. 5,891,633 auf ein Verfahren zur Identifizierung von Mutationen in den Cytochrom-P450-Genen CYP2C9 und CYP2A6.

[0010] Die internationale PCT-Anmeldung WO 95/30772 beschreibt wie berichtet einen CYP2D6 Gen-Polymorphismus verbunden mit einer 9 bp-Insertion im Exon 9, welche verbunden ist mit einer langsameren als der normalen Rate für den Arzneimittel-Metabolismus in Individuen, welche ihn tragen, und folglich diagnostisch genutzt werden kann. PCR-Primer wurden beschrieben zum Ermitteln von Mutationen in Arzneimittel-Metabolismen-Enzymen umfassend die Ermittlung des Debrisoquine-Polymorphismus, Mephenytoin-Polymorphismus und des Acetylierungs-Polymorphismus (US-Patente Nr. 5,648,484 und 5,844,108). Zusätzliche Mutationen wurden identifiziert in CYP2D6 Bufuralol-1'-Hydroxylase umfassend Mutationen an den Positionen 271, 281, 294 und 506, welche zu einem Metabolisierer/schlechter Metabolisierer-Phänotyp führen, wie in der internationalen PCT-Anmeldung WO 91/1 0745 und dem US-Patent Nr. 5,981,174 beschrieben.

[0011] Das japanische Patent Nr. 8168400 stellt ein Verfahren zur Verfügung zur Bestimmung von Mutationen in Exonen 6 und 7 des CYP2C19-Gens. Das japanische Patent Nr. 10014585 beschreibt Primer und Verfahren zur Ermittlung einer Mutation im Exon 5 des CYP2C19, welche mit dem abnormalen Metabolismus von Diazepam, Imipramin, Omeprazol und Propranolol in Beziehung gesetzt wird. Das US-Patent Nr. 5,912,120 beansprucht ein Verfahren zur Diagnostizierung eines Patienten, welcher einen Mangel an S-Mephenytoin 4'-Hy-

droxylase-Wirksamkeit hat, durch Ermittlung von Polymorphismen in den Nukleotiden 681 oder 636.

[0012] Das US-Patent 5,719,026 stellt Verfahren und Primer bereit zur Ermittlung von Polymorphismus in CYP1A2 und zur Bewertung der Änderungen in der mit diesen Polymorphismen verbundenen Arzneimittel-Wirksamkeit von Theophyllin.

[0013] Das japanische Patent Nr. 10286090 beschreibt wie berichtet Verfahren und Primer zur Ermittlung von Mutationen in CYP2E1. Von diese Mutationen wird berichtet, dass sie zur Bestimmung des Sicherheitsspielraums für die Arzneimittelverabreichung bei der Behandlung oder verwandten Krankheiten nützlich sind.

[0014] Trotz dieser Lehren und nach bestem Wissen des Erfinders, hat niemand beschrieben oder vorgeschlagen, dass eine Kombination von Polymorphismen in LQT- und Cytochrom-P450-Genen in Reaktion auf die Verabreichung von einem Arzneimittel oder Arzneimitteln bei einer Person erworbene LQTS hervorrufen kann.

C. Gene der P-Glycoprotein-Pumpe

[0015] Glycoprotein-Pumpe (P-gp) in der Entwicklung von Arzneimittelresistenten Tumorzellen wurde umfangreich untersucht (Lo et al., J. Clin. Pharmacol. 39: 995–1005 (1999)). P-gp ist eine ATP-abhängige Arzneimittel-Pumpe, die eine breite Auswahl von cytotoxischen Wirkstoffen aus dem Zell-Ende extrudiert, wird durch ein Gen genannt MDR-1, für Multi-Arzneimittel-Resistenz, kodiert (Loo et al., Biochem. Cell. Biol. 77: 11–23 (1999) und Robert, Eur. J. Clin. Invest. 29: 536–45 (1999)). Die menschliche P-gp-Sequenz wurde durch Chen et al., Cell 47: 381–9 (1986) beschrieben und hat die GenBank-Zugangs-Nr. M14758.

[0016] Seine physiologische Funktion kann sein, den Körper vor endogenen und exogenen cytotoxischen Wirkstoffen zu schützen. Das Protein hat klinische Bedeutung, weil es zu dem Phänomen der Multi-Arzneimittel-Resistenz während der Chemotherapie (Loo et al., 1999) und zu der Entstehung von simultanen Resistenzen gegenüber multiplen cytotoxischen Arzneimitteln in Krebszellen (Ambudkar et al., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 39: 361–98 (1999)) beiträgt. Im Einzelnen scheint die Überexpression dieser Membran-Pumpe viele Xenobiotika aus der Tumorzelle zu extrudieren (Robert, 1999). Allerdings verbleibt eine beträchtliche Kontroverse über den Wirkmechanismus dieser Ausfluss-Pumpe und ihrer Funktion in normalen Zellen (Ambudkar et al., 1999).

[0017] Multi-Arzneimittel-Resistenz (MDR) kann in Tumoren mittels Verfahren der Molekularbiologie (z. B. Genexpression auf dem mRNA-Level), durch immunologische Verfahren (z. B. Mengenbestimmung des P-Glycoprotein selbst) oder durch Funktionsannäherungen (z. B. Messung der Farbstoffausscheidung) (Robert, 1999) diagnostiziert werden.

[0018] Es wurden Arzneimittel entwickelt, welche die MDR umkehren oder verändern. Zum Beispiel ist PSC-833 ein nicht-immunsuppressives Cyclosporin-Derivat, das wirksam und spezifisch P-gp inhibiert (Atadja et al., Cancer Metastasis Rev. 17: 163–8 (1998)). Ebenso wurden Verbindungen identifiziert, welche die Bioverfügbarkeit von pharmazeutischen Verbindungen erhöhen oder verändern. Siehe, z. B. US-Patente Nr. 6,004,927; 5,962,522; 5,916,566; 5,716,928; 5,665,386 und 5,567,592. Die P-gp-Aktivität wurde durch Expression von für MDR-1 spezifischen Antisense-Nukleotiden modifiziert (US-Patent Nr. 6,001,991). Außerdem wurden Verfahren und Untersuchungen entwickelt, welche feststellen, ob die Multi-Arzneimittel-Resistenz umgekehrt wurde (US-Patent Nr. 5,403,574).

[0019] Es wurden auch Mutationen identifiziert, welche eine Wirkstoff-Wechselwirkung mit P-gp verändern. Beispielsweise offenbart das US-Patent 5,830,697 einzelne und zweifache Mutationen (Phe335 und/oder 336), welche das Spektrum von Kreuz-Reaktivitäten zu Cytotoxinen und die Resistenz zur Modulation durch Cyclosporine verändert. Eine andere Mutation auf V185G im P-gp verleiht eine erhöhte Resistenz gegenüber Colchicin (US-Patent Nr. 5,830,697). P-gp-Empfindlichkeit gegenüber Vinblastin, Colchicin, VP16 und Adriamycin, gebräuchliche chemotherapeutische Wirkstoffe, wurde durch Veränderung von ⁶¹His mit einem anderen Aminosäuren-Rest hoch- und runterreguliert (Taguchi et al., Biochemistry 36: 8883–9 (1997)). Darüber hinaus interagieren verschiedene Arzneimittel unterschiedlich mit dem P-gp und mutierten Formen von P-gp, so dass eine Mutation die Wirksamkeit eines Arzneimittels und nicht eines anderen beeinflussen kann (siehe, z. B., Chef et al., J. Biol. Chem. 272: 5974–82 (1997); Bakos et al., Biochem. J. 323: 777–83 (1997) und Gros et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7289–93 (1991)). Allerdings wurde, trotz der Information bezüglich des Einflusses, den solche Mutationen auf die Arzneimittel-Wirksamkeit haben kann, keine Verknüpfung vorgenommen, P-gp an sich oder in Kombination mit einem anderen Protein zu verbinden, um QT-Intervalle zu beeinflussen

oder Torsades de Pointes zu induzieren.

II. Nucleinsäure-Hybridisierung

[0020] Die Kapazität eines Nucleinsäure-"Sonde"-Moleküls zu einem komplementären Nucleinsäure-"Ziel"-Molekül zu hybridisieren (d. h. Basen-Paar) bildet den Grundstein für einen weiten Bereich an diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen. Hybridisierungsuntersuchungen werden weitreichend in der Molekularbiologie und Medizin eingesetzt. Verfahren zur Durchführung solcher Hybridisierungsreaktionen sind offenbart durch, zum Beispiel, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)), Haymes et al., *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* (IRL Press, Washington, D. C. (1985)) und Keller et al., *DNA Probes* (2nd Ed., Stockton Press, New York (1993)).

[0021] Viele Hybridisierungsuntersuchungen erfordern die Immobilisierung einer Verbindung auf einem festen Träger. Nagata et al., *FEBS Letters* 183: 379–82 (1985) beschrieben ein Verfahren zum Messen von DNA, welches das Anbinden einer unbekannten Menge geklonter DNA auf Mikrotiter-Näpfchen in Anwesenheit von 0,1 M MgCl₂ umfasste. Eine komplementär mit Biotin markierte Sonde wurde anschließend mit der DNA in jedem Näpfchen hybridisiert und die gebundene Sonde kalorimetrisch gemessen. Dahlen et al., *Mol. Cell. Probes* 1: 159–168 (1987) haben die Sandwich-Hybridisierung in Mikrotiter-Näpfchen mittels geklonter, auf den Näpfchen adsorbierter Fänger-DNA diskutiert. Eine Untersuchung zum Ermitteln der HIV-1 DNA mittels PCR-Amplifikation und Hybridisierung in Mikrotiter-Näpfchen wurde ebenfalls berichtet (Keller et al., *J. Clin. Microbiol.* 29: 638–41 (1991)). Die NaCl-vermittelte Verbindung von Oligomeren an Polystyrol-Näpfchen wurde von Cros et al. (Französisches Patent Nr. 2,663,040) und von Nikiforov et al., *PCR Methods Applic.* 3: 285–291 (1994) erörtert. Eine kationische Detergenz-vermittelte Bindung von Oligomeren an Polystyrol-Näpfchen wurde von Nikiforov et al., *Nucleic Acids Res.* 22: 4167–75 (1994) beschrieben.

III. Analyse von Einzelnukleotid-DNA-Polymorphismen

[0022] Viele genetische Erkrankungen und Merkmale (d. h. Hämophilie, Sichelzellenanämie, zystische Fibrose, usw.) spiegeln die Folgen von Mutationen wider, die in den Genomen einiger Mitglieder einer Art durch Mutation oder Evolution aufgetreten sind (Gusella, *Ann. Rev. Biochem.* 55: 831–54 (1986)). In manchen Fällen sind solche Polymorphismen mit einem genetischen Ort verbunden, der für die Erkrankung oder das Merkmal verantwortlich ist; in anderen Fällen sind die Polymorphismen die bestimmende Charakteristik des Zustands.

[0023] Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) unterscheiden sich signifikant von den Polymorphismen des variablen Nukleotidtyps (VNTRs), die sich aus spontanen Tandemwiederholungen von Di- oder Trinukleotid-Wiederholungsmotiven von Nukleotiden ergeben (Weber, US-Patent Nr. 5,075,217; Armour et al., *FEBS Lett.* 307: 113–5 (1992); Horn et al., PCT-Anmeldung WO 91/14003; Moore et al., *Genomics* 10: 654–60 (1991); Hillel et al., *Genet.* 124: 783–9 (1990)) und von den Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen ("RFLPs"), die Variationen umfassen, welche die Längen der Fragmente verändern, die durch eine Spaltung mit Restriktionsendonuklease erzeugt werden (z. B. Fischer et al., (PCT-Anmeldung WO 90/13668) und Uhlen (PCT-Anmeldung WO 90/11369)).

[0024] Da SNPs Variationenstellen bilden, die von Regionen mit einer unveränderten Sequenz umgeben sind, erfordert deren Analyse nicht mehr als die Bestimmung der Identität des einzelnen Einzelnukleotids, das an der Variationsstelle vorliegt. Es ist nicht erforderlich, für jeden Patienten eine vollständige Gensequenz zu bestimmen. Es wurden mehrere Verfahren entwickelt, um die Analyse solcher Einzelnukleotid-Polymorphismen zu erleichtern.

[0025] Beispielsweise diskutiert Mundy, C. R. (US-Patent Nr. 4,656,127) ein Verfahren zur Bestimmung der Identität des Nukleotids, das an einer bestimmten polymorphen Stelle vorliegt, bei dem ein spezifisches exonukleasebeständiges Nukleotidderivat eingesetzt wird.

[0026] Cohen et al. (Französisches Patent 2,650,840 und PCT-Anmeldung WO 91/02087) erörtern ein Verfahren auf Lösungsbasis zur Bestimmung der Identität des Nukleotids einer polymorphen Stelle. Wie in dem Mundy-Verfahren des US-Patents Nr. 4,656,127 wird ein Primer eingesetzt, der zu den allelischen Sequenzen unmittelbar 3' zu einer polymorphen Stelle komplementär ist.

[0027] Zusätzliche SNP-Nachweis-Verfahren umfassen das genetische Bit-Analyse-Verfahren, beschrieben von Goelet et al. (PCT-Anmeldung Nr. 92/15712). Das Verfahren von Goelet et al. verwendet Gemische von

markierten Terminatoren und eines Primers, das zu der Sequenz 3' zu einer polymorphen Stelle komplementär ist.

[0028] Cheesman (US-Patent Nr. 5,302,509) beschreibt ein Verfahren zur Sequenzierung eines Einzelstrang-DNA-Moleküls mittels fluoreszierend markierten 3'-gehemmten Nukleotidtriphosphaten. Eine Vorrichtung für die Trennung, Konzentration und Nachweis eines DNA-Moleküls in einer flüssigen Probe wurde von Ritterband et al. beschrieben (PCT-Patentanmeldung WO 95/17676).

[0029] Mehrere Primer-geführte Nukleotideinbauverfahren zum Testen polymorpher Stellen in DNA wurden beschrieben (Prezant et al., Hum. Mutat. 1: 159–64 (1992); Ugozzoli et al., GATA 9: 107–12 (1992); und Nyren et al., Anal. Biochem. 208: 171–5 (1993)).

IV. Verfahren zur Nucleinsäure-Immobilisierung auf einer festen Phase

[0030] Mehrere der vorstehend beschriebenen Verfahren umfassen Vorgänge, bei denen einer oder mehrere der Nucleinsäurereaktanten auf einem festen Träger immobilisiert werden. Gegenwärtig werden verbreitet 96-Näpfchen-Polystyrolplatten in Festphasen-Immuntests verwendet, PCR-Produktnachweisverfahren, die Bleche als feste Träger einsetzen, und DNA-Chips sind beschrieben worden. Das Mikrotiterplatten-Verfahren erfordert die Immobilisierung einer geeigneten Oligonukleotidsonde in den Mikrotiter-Näpfchen, gefolgt durch das Einfangen des PCR-Produkts durch Hybridisierung und eines geeigneten kalorimetrischen Hapten-Nachweises.

[0031] Kovalente Disulfid-Bindungen wurden vorher verwendet, um beide, Proteine und Oligonukleotide, zu immobilisieren. Chu et al. (Nucl. Acids Res. 16: 3671–91 (1988)) offenbart ein Verfahren zur Kopplung von Oligonukleotiden mit Nucleinsäuren oder Proteinen durch spaltbare Disulfid-Bindungen.

[0032] Gentalen et al., Nucl. Acids Res. 27: 1485–91 (1999) beschreiben ein kooperatives Hybridisierungsverfahren, um eine physikalische Verbindung zwischen zwei Stellen auf einem DNA-Strang aufzubauen mittels Hybridisierung auf einen neuen Typ von Oligonukleotid-Arrays sehr hoher Dichte. Das gleiche Verfahren kann zur Bestimmung von SNP-Haplotypen verwendet werden.

[0033] Yershov et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 4913–8 (1996) beschreiben einen Oligonukleotid-Mikrochip, welcher verwendet wurde, um Beta-Thalassemia-Mutationen in Patienten durch Hybridisierung PCR-vervielfältigter DNA mit den Mikrochips zu ermitteln. Diese Technologie wurde für großtechnische Diagnose in Gen-Polymorphismus-Studien vorgeschlagen.

[0034] Guo et al., Nucl. Acids Res. 22: 5456–65 (1994) beschreiben ein einfaches Verfahren für die Analyse von aufgezogenen genetischen Polymorphismen Allelen-spezifischen Oligonukleotiden, gebunden an Glas-Träger. Dieses Verfahren wurde in parallelen Analysen von 5-Punkt-Mutationen vom Exon 4 des menschlichen Tyrosinase-Gens nachgewiesen.

[0035] Erst kürzlich haben Gilles et al., Nat. Biotechnol. 17: 365–70 (1999) eine schnelle Untersuchung für den SNP-Nachweis mittels elektronischen Schaltungen auf Silizium-Mikrochips beschrieben. Ebenso vergleicht Holloway et al., Hum. Mutat. 14: 340–7 (1999) Verfahren zur Hoch-Durchlauf-SNP-Typisierung unter Verwendung von TaqMan® Flüssigphasen-Hybridisierung, PCR-SSOP oder ARMS-Mikroplatten-Array diagonal Gelelektrophorese (MADGE).

[0036] Da die Weltbevölkerung altert und neue Arzneimittel entdeckt werden, werden mehr und mehr Patienten ein oder mehrere pharmazeutische Zusammensetzungen verabreichen, so dass ein individuelles Arzneimittel oder eine Arzneimittelkombination unerwünschte Reaktionen auf Arzneimittel verursachen kann. Abweichend von dem, was vorher in der Literatur berichtet wurde, beschreibt deshalb der Erfinder hier Verfahren und Zusammensetzungen zur Diagnostizierung von Arzneimittel-Wechselwirkungen, welche mindestens eine Mutation in einem LQT-Gen umfassen. Zusätzliche Mutationen können in bestimmten Cytochrom-450-Genen und P-Glycoprotein-Pumpen vorhanden sein, welche in Übereinstimmung mit einer LQT-Gen-Mutation oder einem anderen Ionenkanal (z. B. K⁺ oder Na⁺)-Gen-Polymorphismus arbeiten, um eine unerwünschte Reaktion auf Arzneimittel oder eine unerwünschte Arzneimittel/Arzneimittel-Reaktion zu bewirken. Die Beschreibung offenbart ferner Kits und Zusammensetzungen zum Diagnostizieren der Neigung einer Person zu QT-Intervall-Verlängerungen in Reaktion auf die Verabreichung von einem oder mehreren pharmazeutischen Wirkstoffen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0037] Es ist ein Ziel der Erfindung, neue und verbesserte Verfahren zum Feststellen, ob eine Person eine Neigung für eine QT-Intervall-Verlängerung oder Torsades de Pointes aufgrund von einem oder mehreren pharmazeutischen Wirkstoffen aufweist, bereitzustellen. Diese Verfahren umfassen den Schritt des Screenens einer biologischen Probe von der Person durch ein Nucleinsäure-Array, wobei der Nucleinsäure-Array Sonden für eine genetische Mutation oder für Polymorphismus in: (1) mindestens einem LQT-Gen und (2) mindestens einem Element, ausgewählt aus der Gruppe, besteht aus dem MDR-Gen und einem Cytochrom-P450-Gen, enthält. Das Nucleinsäure-Array kann ein DNA-Array sein. Das Nucleinsäure-Array kann in der Form eines Chips, eines Mikrochips, eines Kügelchens oder einer Mikrokugel vorliegen. Das LQT-Gen, welches einen Polymorphismus, der eine QT-Intervall-Verlängerung herbeiführt, enthalten kann, umfasst LQT1, LQT2, LQT3, LQT5 und LQT6.

[0038] Das Verfahren kann weiterhin das Screenen beider LQT- und Cytochrom-P450-Gen-Mutationen und Polymorphismen enthalten. Das P450-Cytochrom-Isoform, welches eine Mutation enthalten kann, welche zu einer exzessiven Anreicherung von Arzneimitteln führt und dadurch QT-Intervallverlängerung erzeugt, umfasst: CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A, CYP3A5 und CYP3A7.

[0039] In dem Verfahren der vorliegenden Erfindung kann die Mutation oder der Polymorphismus ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus: HERG (nt 1778, Punktmutation), KCNE1 (nt 226, Punktmutation), KCNQ1 (nt 217, Punktmutation), KCNQ1 (nt 284, Punktmutation), KCNQ1 (nt 475, Punktmutation), KCNQ1 (nt 521, Punktmutation), KCNQ1 (nt 629, Punktmutation), KCNQ1 (nt 655, Punktmutation), KCNQ1 (nt 659, Punktmutation), KCNQ1 (nt 737, Punktmutation), KCNQ1 (nt 746, Punktmutation), KCNQ1 (nt 1378, Punktmutation), KCNQ1 (nt 1244–1250, Deletion-Insertion) und SCN5A (nt 4513–4521, 9 bp Deletion).

[0040] Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist der pharmazeutische Wirkstoff ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Amiodaron, Amitriptylin, Amoxapin, Astemizol, Azelastin, Bepridil, Chlorpromazin, Cisaprid, Clarithromycin, Clemastin, Clomipramin, Desipramin, Diphenhydramin, Disopyramid, Doxepin, Erythromycin, Felbamat, Flecainid, Fluconazol, Fludrocortison, Fluoxetin, Fluphenazin, Fluvoxamin, Fosarnet, Fosphenytoin, Halofantrin, Haloperidol, Ibutilid, Imipramin, Indapamid, Ipecacuanha (Brechwurzel), Isradipin, Itraconazol, Ketoconazol, Levomethadyl, Maprotilin, Moexipril/HCTZ, Moricizin, Naratriptan, Nicardipin, Nortriptylin, Octreotid, Pentamidin, Perphenazin, Pimozid, Probucol, Procainamid, Prochlorperazin, Protriptylin, Quetiapin, Chinidin, Risperidon, Salmeterol, Sotalol, Sparfloxacin, Sumatriptan, Tamoxifen, Terfenadin, Thioridazin, Thiothixen, Tizanidin, Tocainid, Trifluoperazin, Trimethoprim-Sulfamethoxazol, Venlafaxin und Zolmitriptan.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0041] **Fig. 1.** Aufzeichnungen von I_{Kr} , I_{to} (A und B) und I_{K1} (C) in derselben Zelle vor und nach 5-minütiger Superfusion mit 5 $\mu\text{mol/L}$ E-4031. Bild A) I_{Kr} und I_{to} -Ströme vor und nach der Superfusion mit E-4031. E-4031 hebt den I_{Kr} -Tail-Strom auf und reduziert ebenfalls den zeitabhängigen I_{Kr} -Strom, ohne den transienten Auswärts-Strom (I_{to}) oder den Haltestrom zu beeinflussen; Bild B) E-4031 empfindliche Ströme, erhalten durch digitale Subtraktion der Ströme nach der E-4031 Exposition von den Strömen vor der E-4031-Exposition. Man beachte die Einwärts-Gleichrichtung des zeitabhängigen I_{Kr} -Stroms bei sehr positiven Potentialen im Vergleich zu den Tail-Strömen; Bild C) I_{K1} -Strom vor und nach der Superfusion mit E-4031. E-4031 zeigt wenig Wirkung auf den Einwärts- I_{K1} -Strom, aufgezeichnet bei -120 mV. Die Auswärts-Halteströme, die die Amplitude des I_{K1} bei -40 mV darstellen, sind überlagert.

[0042] **Fig. 2.** Aufzeichnungen von I_{Kr} , I_{to} (A und B) und I_{K1} (C) in derselben Zelle vor und nach fünfminütiger Superfusion mit 10 $\mu\text{mol/L}$ Tamoxifen. Bild A) I_{Kr} und I_{to} -Ströme aufgezeichnet vor und nach der Superfusion mit Tamoxifen. Tamoxifen hebt den I_{Kr} -Tail-Strom auf und reduziert ebenfalls den zeitabhängigen I_{Kr} -Strom, ohne den transienten Auswärts-Strom (I_{to}) zu beeinflussen; Bild B) Tamoxifen-empfindliche Ströme, erhalten durch digitale Subtraktion der Ströme vor und nach der Tamoxifen Superfusion. Man beachte die Einwärts-Gleichrichtung der zeitabhängigen I_{Kr} -Ströme bei sehr positiven Potentialen im Vergleich zu den Tail-Strömen und deren Ähnlichkeit zu den E-4031-empfindlichen Strömen; Bild C) I_{K1} -Ströme aufgezeichnet vor und nach der Superfusion mit Tamoxifen. Tamoxifen zeigt keine Hemmung des I_{K1} -Einwärts-Stroms. Die Auswärts-Halteströme, welche die Amplitude von I_{K1} bei -40 mV darstellen, sind zusammen überlagert.

[0043] **Fig. 3.** Zeitabhängige Hemmung von I_{K1} durch Tamoxifen. I_{Kr} -Ströme wurden in derselben Zelle vor der Arzneimittelverabreichung, 3, 5 und 9 Minuten nach der Superfusion mit 1 $\mu\text{mol/L}$ Tamoxifen aufgezeichnet.

[0044] Fig. 4. Spannungs- und konzentrationsabhängige Hemmung von I_{Kr} durch Tamoxifen. I_{Kr} -Tail-Ströme wurden 5–7 Minuten nach der Superfusion mit Tamoxifen gemessen. Bild A) Einfluss von 1 $\mu\text{mol/L}$ I-V-Verhältnis; Bild B) Einfluss von 3,3 $\mu\text{mol/L}$ Tamoxifen auf I-V (Strom-Spannung)-Verhältnis. Messwerte werden wiedergegeben als Durchschnittswerte \pm SD, $n = 4$, $*p < 0,05$.

[0045] Fig. 5. Vergleich der I_{Kr} -Hemmung durch Tamoxifen und Chinidin. Bild A) I_{Kr} -Ströme, aufgezeichnet von derselben Zelle vor der Arzneimittelverabreichung, 5 Minuten nach der Superfusion mit 10 $\mu\text{mol/L}$ Tamoxifen und 5 Minuten nach Ausspülen. I_{Kr} -Tail-Ströme wurden durch Tamoxifen ohne Erholung aufgehoben. Bild B) I_{Kr} -Ströme, aufgezeichnet von einer anderen Zelle vor der Arzneimittelverabreichung, 5 Minuten nach der Superfusion mit 10 $\mu\text{mol/L}$ Chinidin und 3 Minuten nach dem Ausspülen, zeigen, dass I_{Kr} -Tail-Ströme verringert werden, aber nicht durch Chinidin aufgehoben werden, mit partieller Erholung nach 3-minütigem Ausspülen. Bild C) Hemmung des I_{Kr} durch 3,3 $\mu\text{mol/L}$ Tamoxifen und 3,3 $\mu\text{mol/L}$ Chinidin. Die Messwerte werden wiedergegeben durch Durchschnittswerte \pm SD, $n = 4$, $**p < 0,01$.

[0046] Fig. 6. Einfluss von Tamoxifen auf die Aktionspotentialdauer (APD). Aktionspotentiale werden ausgelöst durch Einspritzen von 100 pA Depolarisierungsströmen von 2 ms, bei einer Frequenz von 0,45 Hz. Gezeigt in der Figur sind zwei überlagerte Aktionspotentialverfolgungen, aufgezeichnet in einem einzelnen ventrikulären Myozyten vor und 4 Minuten nach Exposition gegenüber 3,3 $\mu\text{mol/L}$ Tamoxifen. Die zwei Kurven sind Durchschnittskurven von 16 Versuchen.

[0047] Fig. 7. Einfluss von Tamoxifen auf den L-Typ- I_{Ca} . I_{Ca} wurde aufgezeichnet in derselben Zelle vor der Tamoxifen-Verabreichung und 1, 2, 3, 4 Minuten nach der Superfusion mit 10 $\mu\text{mol/L}$ Tamoxifen sowie 2, 4, 8 und 16 Minuten nach dem Ausspülen. Man beachte die markierte Hemmung von I_{Ca} und die partielle Rückgewinnung nach dem Ausspülen.

[0048] Fig. 8. Basislinien-QTc-Intervalle in Frauen während der drei Phasen des Menstruationszyklus' und in Männern. Balken bezeichnen Mittelwerte und SEM, $n = 20$ Männer und 20 Frauen.

[0049] Fig. 9. Veränderungen in QTc in Männer und Frauen (menstruale Phase).

[0050] Fig. 10. Funktion von verzögerten Gleichrichter-Kaliumströmen auf die spontane Schlagfrequenz von Kardiomyozyten. Bild A. Effekt von Chromanol 293B auf die spontane Klopfrate in kultivierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten. Bild B. Einfluss von E-4031 (10 μM) allein und in Kombination mit 293 (μM) und Isoproterenol (1 μM) auf die spontane Schlagfrequenz von kultivierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0051] Die Erfindung umfasst ein Verfahren zum Feststellen der Neigung einer Person zu einer ungewünschten Reaktion auf Arzneimittel, einhergehend mit einem verlängerten QT-Intervall, welche resultiert aus einer exzessiven Anreicherung von Arzneimitteln aufgrund von genetischen Polymorphismen oder Mutationen in wenigstens zwei Gen-Klassen, welche zu potentiell fatalen kardialen Arrhythmien führen kann. Die Arzneimittel erfassen eine Reihe von Pharmazeutika einschließlich Antiarrhythmika, Antipsychotika, Antidepressiva, Antianginale, Antibiotika, Antifungale, Antivirale, Diuretika, Arzneimittel gegen Migräne, Therapeutika gegen Geisteskrankheiten, Therapeutika gegen Brustkrebs, Anxiolytika, Wirkstoffen gegen Brechreiz, kardiale Medikation, Opiatantagonisten, Antihypertensive, Antiinfektiva und Antikonvulsiva. Das erfindungsgemäße Verfahren zum Feststellen des Potentials der unerwünschten Reaktion auf Arzneimittel verwendet ein DNA-Array (z. B. DNA-Chip), welcher zur Untersuchung einer biologischen Probe eines Patienten verwendet werden kann. Zum Beispiel kann eine DNA-Probe eines Patienten einen DNA-Array durchlaufen, um zu diagnostizieren, ob der Patient irgendeine genetische Mutation oder irgendeinen Polymorphismus hat, die mit einer verlängerten kardialen Repolarisation verbunden ist. Bevorzugte Gene, welche direkt oder indirekt mit verlängerter Repolarisation verbunden sind, umfassen LQT-Gene, veränderte Empfindlichkeitsgene (z. B. MiRP1-Gene oder verwandte Gene) und verstärkte Expositionsgene (Cytochrom-P450-Gene und MDR-Gene).

I. Begriffbestimmungen

[0052] "bp" oder "Basen-Paar" bedeutet das Wasserstoff-gebundene Purin- und Pyrimidin-Paar in einer Doppelstrang-Nucleinsäure. Üblicherweise sind die Paare in der DNA Adenin (A) und Thymin (T), und Guanin (G) und Cytosin (C). In der RNA sind die Paare Adenin (A) und Uracil (U), und Guanin (G) und Cytosin (C).

[0053] "Nukleotid" oder "nt" bedeutet das Nukleotid, üblicherweise eine DesoxyriboNucleinsäure des Typs

Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G), Uracil (U) und Cytosin (C), üblicherweise in der sense- oder Kodierungs-ausrichtung, kann aber ebenfalls antisense-Ausrichtungen der Gene oder Kodierungssequenz umfassen.

[0054] "Nucleinsäure" oder "Nucleinsäure-Molekül" bedeutet ein Desoxyribonukleotid- oder Ribonukleotid-Polymer in entweder Einzel- oder Doppelstrang-Form, und würde, sofern nicht anderweitig begrenzt, bekannte Analoge von natürlichen Nukleotiden, die in einer ähnlichen Weise wie natürlich auftretende Nukleotide arbeiten können, umfassen.

[0055] "aa" bedeutet Aminosäure.

[0056] "Gen" bedeutet eine Einheit des Erbguts, die eine spezifische Stelle auf einem Chromosom (chr) besetzt, dessen Existenz bestätigt werden kann durch die Häufigkeit von verschiedenen allelischen Formen. Bevorzugte Gene dieser Anmeldung sind jene, welche die kardiale Repolarisation beeinflussen, besonders jene, welche Verlängerungen der kardialen Repolarisation bewirken, Gene, welche die Abspaltung von Arzneimitteln von einem Wirt bedingen, und Gene, welche die Zeit, die benötigt wird, um ein Arzneimittel von dem Wirt abzuspalten, verlängern. Dies kann Cytochrom-P450-Gene und Ionenkanal-Gene umfassen.

[0057] "Mutation" bedeutet einen einzelnen oder mehrere Nukleotid-Austauschvorgänge in der DNA- oder RNA-Sequenz eines Organismus'. Zum Beispiel kann eine solche Mutation eine Rasterschub-Mutation, eine sinnentstellende Mutation oder eine sinnverändernde Mutation sein.

[0058] "Polymorphismus" bedeutet die Existenz, in einer Population, von zwei oder mehreren Allelen eines Gens, wobei die Häufigkeit der selteneren Allelen größer ist als allein durch wiederholte Mutation erklärt werden könnte (üblicherweise größer als ein Prozent). Diese Polymorphismen können aus einer oder mehreren Nukleotid-Abweichungen bestehen. Die Polymorphismen können ruhend sein, wobei sie keinen Wechsel in der gebundenen Aminosäuresequenz übertragen. Alternativ kann der Polymorphismus einen verbundenen Wechsel in der durch das Gen kodierten Aminosäuresequenz verursachen.

[0059] "Veränderte Empfindlichkeitsgene" sollen Gene umfassen, welche, wenn sie mutiert sind, die Expression von Proteinen verändern, was daraufhin zu einer veränderten Empfindlichkeit gegenüber einem Arzneimittel oder Arzneimitteln führt. Solche Gene können zum Beispiel das Kaliumionenkanal-Gen, MiRP1 oder verwandte Gene umfassen.

[0060] "Erhöhtes Expositionsgen" soll Gene umfassen, welche, wenn aberrierend in einer Person exprimiert, zur erhöhten Exposition gegenüber einem Arzneimittel oder Arzneimitteln führ. Solche Gene können Cytochrom-P450-Gene, welche, wenn sie mutiert sind, zur Verminderung oder aberrierender Expressionen von Enzymen führen, die für die Eliminierung von Arzneimitteln oder eines Arzneimittels benötigt werden, umfassen. Erhöhte Expositionsgene umfassen auch Multi-Arzneimittel-Resistenz-Gene (MDR). Mutationen in den MDR-Genen können zur veränderten Verteilung (und dadurch erhöhter Exposition) von einem Arzneimittel oder Arzneimitteln in Geweben oder einem Gewebe führen. MDR-Gene kodieren Membran-Arzneimittel-Transporter und/oder Ionenkanal-Proteine.

[0061] "Ionenkanal-Gene" soll Multi-Arzneimittel-Resistenz-Gene (MDR-Gene) sowie Ionen-Pumpe-Gene, wie die LQT-Genfamilie, bestimmte Natrium(Na^+)kanal-Gene (siehe z. B. Chef et al., Nature 392: 293–6 (1998)) und bestimmte Kalium(K^+)kanal-Gene umfassen. Zum Beispiel ist das Kaliumionenkanal-Gen, MiRP1, ein bevorzugtes Beispiel für einen Kaliumionenkanal, welcher mit QT-Intervallverlängerung in Verbindung gebracht werden kann; MiRP1-Protein bildet Kanäle mit HERG und seine Mutationen sind mit kardialer Arrhythmie verbunden. Bevorzugte MDR-Gene umfassen MDR-1, welches die P-Glycoprotein-Pumpe (P-gp) kodiert.

[0062] "Verlängertes QT-Intervall", "QT-Intervallverlängerung" oder "QT-Intervallausdehnung" bedeutet das QT-Intervall, gemessen vom QRS-Beginn bis zum Ende der T-Welle (QT_o) und vom QRS-Beginn bis zur Spitze der T-Welle (QT_m), reguliert auf eine Herzfrequenz von 60 Schlägen pro Minute, welche QT_c ist. "QT_c" bezieht sich auch auf das Bazett-korrigierte QT-Intervall. Siehe, z. B., Kligfield et al., J. Am. Coll. Cardiol. 28: 1547–55 (1996). Verlängerte QT-Intervalle können direkt oder indirekt durch mindestens zwei genetische Mutationen oder Polymorphismus hervorgerufen werden. Diese Mutationen oder Polymorphismen befinden sich in zwei oder mehreren Gengruppen (z. B. mindestens eine Mutation oder Polymorphismus pro Gengruppe), wobei die Gruppen (1) LQT-Gene, (2) veränderte Empfindlichkeitsgene (z. B. MiRP1-Gene) oder (3) erhöhte Expositionsgene (z. B. MDR-Gene oder Cytochrom-P450-Gene) sind.

[0063] "Torsades de Pointes" oder "TdP" ist eine seltene Variante der ventrikulären Tachykardie (VT). Die

zugrunde liegende Etiologie und Handhabung von TdP ist in der Regel sehr verschieden von der stärker verbreiteten ventrikulären Tachykardie. TdP ist eine polymorphe ventrikuläre Tachykardie, in welcher die Morphologie des QRS-Komplexes sich von Schlag zu Schlag verändert. Die ventrikuläre Frequenz kann schwanken zwischen 150/Min bis ungefähr 250/Min. In den meisten Fällen gibt es eine konstant veränderliche Wellen-Form, aber es darf keine Regelmäßigkeit der Veränderungen der Achsen geben. Die Definition erfordert ebenfalls, dass der QT-Intervall merklich erhöht wird (üblicherweise bis 600 msec oder größer). Fälle von polymorpher VT, welche nicht mit einem verlängerbaren QT-Intervall verbunden sind, werden als generische VT behandelt. TdP tritt üblicherweise in Ausbrüchen, die sich nicht fortsetzen, auf, daher hat man üblicherweise einen Rhythmus-Streifen, welcher die Basislinien QT-Verlängerung des Patienten zeigt.

[0064] "Neigung" (Prädisposition) bedeutet die Tendenz einer Person TdP de Pointes oder QT-Intervallverlängerung zu entwickeln. Diese Tendenz kann erworben oder vererbt sein. Die bevorzugte Person ist eine menschliche Person. Die Neigung ist verbunden mit dem Hervorrufen von TdP oder QT-Intervallverlängerung nach der Verabreichung von einem oder mehreren pharmazeutischen Wirkstoffen, welche TdP oder QT-Intervallverlängerung hervorrufen. Diese pharmazeutischen Wirkstoffe können jene sein, die hier aufgelistet sind oder jedes später entdeckte investigative Arzneimittel, welches QT-Intervallverlängerungen hervorruft.

[0065] "LQTS" oder "long QT-Syndrom" bedeutet eine genetische Erkrankung, welche Individuen zur ventrikulären Arrhythmie prädisponiert, die zur Ohnmacht oder plötzlichem Tod führt. Kongenitales oder idiopathisches LQTS ist eine angeborene Form der Erkrankung und ist genetisch heterogen (Wei et al., Circulation 92: 1-275 (1995)) und umfasst die Jervell-Lange-Nielsen und die Romano-Ward-Syndrome (Napolitano et al., Drugs 47: 51-65 (1994)). Erworbene verlängerte QT-Syndrome sind weitgehend iatrogen, und können durch bestimmte Arzneimittel hervorgerufen werden oder mit metabolischen Störungen verbunden sein (z. B. Hypokaliämie, Hypokalzämie oder Magnesiummangel) (Napolitano et al., 1994).

[0066] "Person", "Patient" oder "Individuum" bedeutet ein Säugetier, insbesondere ein Mensch.

[0067] "Nucleinsäure-Array" bedeutet ein Träger, auf dem ein oder mehrere, bevorzugt 50 oder mehr, besonders bevorzugt 100-1000 oder mehr, und besonders bevorzugt 500 bis 5000 oder mehr Nucleinsäuren aufgebracht werden. Ebenfalls in Erwägung gezogen werden Arrays mit 5000 bis 500000 aufgetragenen Nucleinsäuren. Ein Beispiel für ein solches Array ist ein DNA-Chip-Array. Zum Beispiel siehe US-Patent Nrs. 5,981,956 und 5,922,591. Andere Beispiele umfassen Flow-thru-Chip-Ö Probe Arrays-Ö der Gene Logic (US-Patent Nr. 5,994,068) oder die FlowMetrix-Technologie (z. B. Mikrokugeln) von Luminex. Diese Arrays werden in Erwägung gezogen Nucleinsäuren für Wildtyp- und mutierte Gene, welche Ionenkanal-Gene und/oder Cytochrom-P450-Gene oder Isoforme hiervon kodieren, zu enthalten.

[0068] "Mutation", "Mutant" oder "mutiert" bedeutet das Verweisen auf eine genetische Veränderung (z. B. Rasterschub-Mutation, sinnentstellende Mutation, sinnverändernde Mutation, Deletion oder Insertion) in einem Gen (z. B. Ionenkanal-Gen, P-gg- oder Cytochrom-P450-Gen), welche zu einer veränderten Gen-Expression und/oder einer veränderten Proteinfunktion führt.

[0069] "Isoform" bedeutet verschiedene Formen eines Proteins, das von verschiedenen Genen oder von demselben Gen durch alternatives RNA-Spleißen erzeugt werden kann.

[0070] "Bindet im Wesentlichen" bedeutet die komplementäre Hybridisierung zwischen einem Oligonukleotid und einer Zielsequenz. "Hybridisierung" bedeutet die Bindung von zwei Einzelstrang-Nucleinsäuren über komplementäre Basen-Paarung.

[0071] Der Begriff "Primer" bezieht sich auf ein Oligonukleotid, ob natürlich oder synthetisch, welches in der Lage ist, als Initiationspunkt für eine DNA-Synthese zu fungieren, unter Bedingungen, in denen die Synthese eines Primer-Ausdehnungsprodukts komplementär zu einem Nucleinsäure-Strang erzeugt wird, z. B. in der Anwesenheit von vier verschiedenen Nukleosidtriphosphaten und einem Agens zur Polymerisation (z. B. DNA-Polymerase oder Reverse Transcriptase) in einem geeigneten Puffer und bei einer angemessenen Temperatur. Ein Primer ist vorzugsweise ein Einzelstrang-Oligodesoxyribo-Nukleotid. Die geeignete Länge eines Primers hängt ab von der beabsichtigten Verwendung des Primers, schwankt aber üblicherweise zwischen 15 bis 30 Nukleotiden. Kurze Primer-Moleküle erfordern in der Regel kältere Temperaturen, um ausreichend stabile Hybrid-Komplexe mit einem Templat auszubilden. Ein Primer muss nicht die genaue Sequenz des Templates wiedergeben, muss aber ausreichend komplementär sein, um mit dem Templat zu hybridisieren. Der Begriff "Primer" kann sich auf mehr als einen Primer beziehen, insbesondere in einem Fall, bei dem in der Information betreffend ein oder beide Enden der zu duplizierenden Zielregion eine Unklarheit auftritt. Etwa, wenn

eine Region ein beträchtliches Maß an Polymorphismus oder Mutation in einer Population aufweist, können Gemische von Primern hergestellt werden, die veränderte Sequenzen vermehren. Ein Primer kann, falls gewünscht, gekennzeichnet werden durch Einfügung einer Markierung, die durch spektroskopische, photochemische, biochemische, immunochemische oder chemische Mittel nachweisbar ist. Zum Beispiel umfassen gebräuchliche Markierungen ^{32}P , fluoreszierende Farbstoffe, Elektronen-Dichte-Reagenzien, Enzyme (wie üblich verwendet in einem ELISA), Biotin oder Haptene und Proteine, für welche Antisera oder monoklonale Antikörper verfügbar sind. Eine Markierung kann auch verwendet werden, um den Primer "aufzufangen", um so die Immobilisierung von entweder dem Primer oder dem Primer-Ausdehnungsprodukt, wie z. B. vervielfältigte DNA, auf einem festen Träger zu vereinfachen.

[0072] Wie hier verwendet und sofern nicht anders beschrieben, bezieht sich "pharmazeutischer Wirkstoff" auf einen Wirkstoff oder ein Arzneimittel, welches allein oder in Kombination mit einem oder mehreren anderen pharmazeutischen Wirkstoffen in einem Patienten verlängerte kardiale Repolarisation hervorrufen kann. Die spezifischen pharmazeutischen Wirkstoffe, die QT-Intervallverlängerungen hervorrufen können, sind hier bestimmt.

[0073] " I_{Kr} " bedeutet den schnellen Hauptrepolarisierungsstrom in einer Zelle, auch bekannt als schnelle Komponente des verzögerten Gleichrichter-Kaliumstroms. " I_{Ks} " bedeutet die langsame Komponente des verzögerten Gleichrichter-Stroms. " I_{K1} " bedeutet Einwärts-Gleichrichter-Strom. Beide, I_{Kr} und I_{K1} , sind Formen von Kaliumstromdichten. " I_{to} " bedeutet den transienten Auswärts-Strom einer Zelle, wie in einer Spannungs-Clamp-Untersuchung gemessen.

[0074] "Biologische Probe" und "Probe" bedeutet eine Sammlung von biologischem Material einer Person, enthaltend Nukleus-bildende Zellen. Dieses biologische Material kann festes Gewebe, z. B. von einem frischen oder konservierten Organ oder einer Gewebeprobe, Biopsie- oder bukkaler Abstrich; Blut oder Blut-Bestandteile; Körperflüssigkeiten wie Fruchtwasser, peritoneale Flüssigkeit, oder interstitiale Flüssigkeit etc., sein. Die Probe kann Verbindungen enthalten, welche nicht natürlich mit dem biologischen Material vermischt sind, wie Konservierungsmittel, Gerinnungshemmer, Puffer, Fixiermittel, Nährstoffe, Antibiotika oder ähnliches.

II. Pharmazeutische Wirkstoffe

[0075] Die Offenbarung bezieht sich auch auf die Identifikation eines pharmazeutischen Wirkstoffs oder von Kombinationen von Wirkstoffen, die QT-Intervallverlängerung bei einer Person, besonders einem Menschen, hervorrufen. Wirkstoffe und Kombinationen von Wirkstoffen, die die Ausdehnung von QT-Intervallen hervorrufen, umfassen die in der nachstehenden Tabelle aufgelisteten, sind aber nicht hierauf begrenzt. Mehrere dieser Arzneimittel wurden analysiert und wurden identifiziert, welche das QT-Intervall in einer konzentrationsabhängigen Weise verlängern (siehe, z. B., Drici et al., J. Clin. Psychopharmacol. 18: 477–81 (1998)).

Tabelle 2

Pharmazeutische Wirkstoffe				
Arzneimittel	Markenname	Arzneimittel-Klasse	QT [†]	TdP [†]
Amiodaron	Cordarone [®]	Antiarrhythmikum	Ja	Ja
Amitriptylin	Elavil [®] , Endep [®]	Antidepressivum	Ja	Ja
Amitriptylin HCl-Perphenazin	Etrafon [®]	Antidepressivum Antipsychotikum		
Amoxapin	Asendin [®]	Antidepressivum	Ja	
Astemizol	Hismanal [®]	Antihistaminikum	Ja	Ja
Azelastin	Astelin [®]	Antihistaminikum	Ja	
Bepridil	Vascor [®]	Antianginal	Ja	Ja
Chlorpromazin	Thorazine [®]	Geisteskrankheit Breachreiz, Erbrechen	Ja	Ja

Cisaprid	Propulsid®	stimulierende Darmbeweglich- keit	Ja	Ja
Clarithromycin	Abbotic, Biaxin®, Bicrolid, Clacine, Clambiotic, Clari- bid, Clarith, Klacid, Klaricid, Klarin, Macladin Naxy, Veclam	Antibiotikum	Ja	
Celmastin	Tavist®	Antihistaminikum		vielleicht_
Clomipramin	Anafranil®	Geisteskrankheit	Ja	
Desipramin	Norpramin®	Antidepressivum	Ja	
Diphenhydramin	Benadryl®	Antihistaminikum		vielleicht_
Disopyramid [†]	Norpac®	Antiarrhythmikum	Ja	Ja
Doxepin	Sinequan®, Zona- lon®	Antidepressivum	Ja	Ja
Erythromycin [†]	(Akne-Mycin®, E. E. S.®, EryDerm®, Erygel®, EryTab®, Erythrocin®, Eryth- romycin Base Film- tab®, Erythrosta- tin®, E-mycin, Ery- Peds, PCE	Antibiotikum und intestinale Stimu- lanz	Ja	Ja
Felbamat	Felbatol®	Antikrampfmittel	Ja?	Ja
Flecainid	Tambacor®	Antiarrhythmikum	Ja	Ja
Fluconazol	Diflucan®	Antifungal		
Fludrocortison	Florinef®	Blutdruck hal- tend/Speichern von Natrium	Ja	
Fluoxetin	Prozac®	Antidepressivum	Ja	
Fluphenazin	Prolixin®	Geisteskrankheit, Parkinson Krank- heit	Ja	Ja
Fluvoxamin	Luvox®	Antidepressivum		
Foscarnet	Foscavir®	Antiviral	Ja	
Fosphenytoin	Cerebyx®	Hydantoin	Ja	
Halofantrin [†]		Antimalaria	Ja	Ja
Haloperidol	Haldol®	Geisteskrankheit, Ruhelosigkeit	Ja	Ja
Ibutilid [†]	Corvert®	Antiarrhythmikum	Ja	Ja
Imipramin	Tofranil®	Antidepressivum	Ja	
Indapamid	Lozol®	Diuretikum	Ja	vielleicht_
Isradipin	Dynacirc®	Kardiales Arznei- mittel	Ja	
Itraconazol	Sporanox®	Antifungal, Antibio- tikum		
Ketoconazol	Nizoral®	Antifungal		
Levomethadyl	Orlaam®	Opiat-Agonist	Ja	
Maprotilin	Ludiomil®	Antidepressivum	Ja	Ja

Moexipril/HCTZ	Uniretic®	Blutsenkende Mittel	Ja	
Moricizin	Ethmozine®	Antiarrhythmikum		Ja
Naratriptan	Amerge®	Migränetherapie	Ja	
Nicardipin	Cardene®	Kardiales Arzneimittel	Ja	
Nortriptylin	Pamelor®, Aventyl®	Antidepressivum	Ja	
Octreotid	Sandostatin®	nicht klassifiziert	Ja	
Pentamidin [†]	Pentacarinat®, Pentam®, Nebu-Pent®	Antinfektikum	Ja	Ja
Perphenazin	Trilafon®	Geisteskrankheit	Ja	Ja
Pimozid [†]	Orap®	Tourette Syndrom, Krämpfe	Ja	Ja
Probucol	Lorelco®	Cholesterin-Senker	Ja	Ja
Procainamid	Procan®, Procan-bid®, Pronestyl®	Antiarrhythmikum	Ja	Ja
Prochlorperazin	Compazine®	Brechreiz		vielleicht_
Protriptylin	Vivactil®	Antidepressivum	Ja	
Quetiapin	Seroquel®	Antipsychotikum	Ja	
Chinidin [†]	Cardioquin®, Duraquin®, Quinidex®, Quinaglute®	Antiarrhythmikum	Ja	Ja
Risperidon	Risperdal®	Geisteskrankheit	Ja	Ja
Salmeterol	Serevent®	Sympathomimetikum Adrenolytikum	Ja	
Sotalol®	Betapace®	Antiarrhythmikum	Ja	Ja
Sparfloxacin	Zagam®	Antibiotikum (Pneumonie und Bronchitis)	Ja	Ja
Sumatriptan	Immitrex®	Migränebehandlung	Ja	
Tamoxifen	Nolvadex®	Brustkrebstherapeutikum	Ja	
Terfenadin [†]	Seldane®	Antihistaminikum	Ja	Ja
Thioridazin	Mellaril®	Geisteskrankheit	Ja	Ja
Thiothixen	Navane®	Geisteskrankheit	Ja	Ja
Tizanidin	Zanaflex®	Muskelrelaxans	Ja	
Tocainid	Tonocard®	Antiarrhythmikum	Ja	

Trifluoperazin	Stelazine®	Geisteskrankheit	Ja	Ja
Trimethoprim Sul- famethoxazol	Bactrim®, Septra®, Trimeth-Sulfa®	Antibiotikum		vielleicht_
Venlafaxin	Effexor®	Antidepressivum	Ja	
Zolmitriptan	Zomig®	Migränebehand- lung	Ja	
<p>*Die Bezeichnung "QT" gibt an, dass QT-Verlängerung in der Arzneimittelkennzeichnung als eine potente Wirkung des Arzneimittels genannt ist. Die Bezeichnung "TdP" gibt an, dass die FDA beschlossen hat, dass die Gefahr besteht, dass das Arzneimittel das Syndrom von Torsades de Pointes hervorruft.</p> <p>_ Es gibt Berichte in der medizinischen Literatur, die besagen, dass das Arzneimittel Torsades de Pointes verursachen kann, aber die FDA nicht erklärt, dass das Arzneimittel TdP hervorrufen kann.</p> <p>* Für diese Arzneimittel scheinen Frauen ein größeres Risiko für TdP zu sein als Männer (üblicherweise zweifach).</p>				

[0076] Zusätzlich zur unerwünschten Reaktion bei einer Person auf einen einzelnen pharmazeutischen Wirkstoff, wie die oben Aufgelisteten, können bestimmte dieser Wirkstoffe unerwünschte Reaktionen bei spezifischen Personen nur dann hervorrufen, wenn sie mit einem oder mehreren anderen Wirkstoffen kombiniert werden. Dies beruht auf zwei oder mehreren genetischen Polymorphismen, die in zwei oder mehreren Gen-Klassen gefunden werden. Die Mutationen und Polymorphismen würden in einem oder mehreren von diesen Genen in zwei oder mehreren von diesen Gen-Klassen auftreten. Diese Gen-Klassen umfassen (1) LQT-Gene, (2) veränderte Empfindlichkeitgene und (3) erhöhte Expositionsgene. Zum Beispiel können die Mutationen in einem LQT-Gen und einem Cytochrom-P450-Gen oder in MiRP1 und LQT3 auftreten. Die Polymorphismen oder Mutationen verursachen in der Regel eine aberrante Enzym-Aktivität, welche sich in einer unerwünschten Reaktion auf Arzneimittel entweder aufgrund von veränderter Empfindlichkeit gegenüber den Arzneimitteln oder von erhöhter Arzneimittlexposition auswirkt. Arzneimittel, welche wahrscheinlich mit unerwünschten Arzneimittel-Arzneimittel-Wechselwirkungen aufgrund von Polymorphismen zum Teil in den P450-Genen verbunden sind, sind in der nachstehenden Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3

Arzneimittel-Wechselwirkungen teilweise hervorgerufen durch Cytochrom-P450-Gene				
Arzneimittel	Markenname	Wechselwirkung [†]	QT	TdP
Amiodaron	Cordarone®	1A2 Inhibitor 2C9 Inhibitor 2D6 Inhibitor 3A Inhibitor	Ja	Ja
Amitriptylin	Elavil®, Endep®	1A2 Träger 2C19 Träger 2C9 Träger 2D6 Träger	Ja	Ja
Astemizol	Hismanal®	3A Träger	Ja	Ja
Cisaprid	Propulsid®	3A Träger	Ja	Ja
Clarithromycin	Abbotc, Biaxin®, Bicrolid, Clacine, Clambiotic, Clari- bid, Clarith, Klacid, Klaricid, Klarin, Macladin, Naxy, Veclam	3A Träger 3A Inhibitor	Ja	
Clemastin	Tavist®	Wechselwirkungen		vielleicht_

Clomipramin	Anafranil	1A2 Träger 2C19 Träger 2D6 Träger 2D6 Inhibitor	Ja	
Desipramin	Norpramin®	2D6 Träger	Ja	
Erythromycin [†]	(Akne-Mycin®, E. E. S.®, EryDerm®, Erygel®, Ery-Tab®, Erythrocin®, Eryth- romycin Base Filintab®, Erythros- tatin®, Emycin, EryPeds, PCE	3A Träger 3A Inhibitor	Ja	Ja
Felbamat	Felbatrol®	2C19 Inhibitor	Ja	Ja
Flecainid	Tambocor®	2D6 Träger	Ja	Ja
Fluconazol	Diflucan®	2C9 Inhibitor 3A Inhibitor		
Fluoxetin	Prozac®	2C9 Träger 2D6 Träger 2C19 Inhibitor 2D6 Inhibitor 3A Inhibitor	Ja	
Fluphenazin	Prolixin®	Wechselwirkungen	Ja	Ja
Fluvoxamin	Luvor®	1A2 Träger 2D6 Träger 1A2 Inhibitor 2C19 Inhibitor 2C9 Inhibitor 3A Inhibitor		
Halofantrin [†]		2D6 Inhibitor	Ja	Ja
Haloperidol	Haldol®	1A2 Träger 2D6 Träger 3A Träger 2D6 Inhibitor	Ja	Ja
Imipramin	Tofranil®	1A2 Träger 2C19 Träger 2D6 Träger	Ja	
Itraconazol	Sporanox®	3A Inhibitor		
Ketoconazol	Nizoral®	2C19 Inhibitor 3A Inhibitor		
Protriptylin	Vivactil®	Wechselwirkungen	Ja	
Chinidin [†]	Cardioquin®, Du- raquin®, Quini- dex®, Quinaglute®	3A Träger 2D6 Inhibitor	Ja	Ja
Risperidon	Risperdal®	2D6 Träger	Ja	Ja
Tamoxifen	Nolvadex®	2C9 Träger	Ja	

Terfenadin [†]	Seldane [®]	3A Träger	Ja	Ja
Thioridazin	Mellaril [®]	2D6 Träger	Ja	Ja
Trimethoprim Sul- famethoxazol	Bactrim [®] , Septra [®] , Trimeth-Sulfa [®]	potentieller 2C9 In- hibitor		vielleicht_
Venlafaxin	Effexor [®]	2D6 Träger	Ja	
* [†] "Wechselwirkungen" gibt an, dass Arzneimittel-Arzneimittel-Wechselwirkungen einhergehend mit diesem Arzneimittel vorliegen. Der Eintrag in dieser Spalte gibt das Cytochrom-P450-Isoform an, für welches das Arzneimittel entweder ein Träger oder ein Inhibitor ist.				

III. Kits und Verfahren zur Diagnostizierung von Patienten mit einer Neigung zu QT-Intervallverlängerungen

[0077] Obwohl mehr als 120 Mutationen in Patienten mit LQTS beschrieben wurden, verursachen nicht all diese Mutationen QT-Intervallverlängerung in einer Person nach der Verabreichung eines spezifischen pharmazeutischen Wirkstoffs oder von Wirkstoffen. Einige Gen-Mutationen, verantwortlich für QT-Intervallverlängerungen in einer Person umfassen die in der nachstehenden Tabelle 7 Aufgelisteten, aber beschränken sich nicht hierauf.

Tabelle 7

Gen	aa Position	nt Position	Mutationstyp	*Referenz ¹
CYP2D6*4		¹⁹³⁴ G [®] A	Spleißstellende-fekt	(53 Oscarson et al., Mol. Pharmacol. 52: 1034–40 (1997); Topic et al., Clin. Chem. Lab. Med. 36: 655–8 (1998))
CYP2D6*10			C188C1T im Exon 1	Someya et al., Psychiatry Clin. Neurosci. 53: 593–7 (1999)
CYP2D6* 17/*17		¹¹¹¹ C [®] T ²⁹³⁸ C [®] T ⁴²⁶⁸ G [®] C	Punktmutationen	Masimirembwa et al., Br. J. Clin. Pharmacol. 42: 713–9 (1996)
HERG	593	1778	Punktmutation	Benson et al., Circulation 93: 1791–5 (1996)
KCNE1	76	226	Punktmutation	Schulze-Bahr et al., Nature Genet. 17: 267–8 (1997)
KCNQ1	73	217	Punktmutation	Donger et al., Circulation 96: 2778–81 (1997)
KCNQ1	95	284	Punktmutation	Wang et al., Nature Genet. 12: 17–23 (1996)
KCNQ1	159	475	Punktmutation	Wang et al., (1996)
KCNQ1	174	521	Punktmutation	Donger et al., (1997)
KCNQ1	210	629	Punktmutation	Neyroud et al., Eur. J. Hum. Genet. 6: 129–33 (1998)
KCNQ1	219	655	Punktmutation	Russell et al., Hum. Molec. Genet. 5: 1319–24 (1996)
KCNQ1	220	659	Punktmutation	Donger et al., (1997)
KCNQ1	246	737	Punktmutation	Wang et al., (1996)
KCNQ1	249	746	Punktmutation	Donger et al., (1997)
KCNQ1	460	1378	Punktmutation	Donger et al., (1997)
KCNQ1	415	1244–1250	Deletion-Insertion	Neyroud et al., (1998)
SCN5A	1505–1507	4513–4521	9 bp Deletion	Wang, Hum. Molec. Gen. 4: 1603–7 (1995)

[0078] Nucleinsäuren, welche diese Mutationen erkennen, können in einem Array auf einem Träger angebracht werden, wie auf einem Chip (z. B. DNA-Chip oder Mikrochips). Diese Arrays können auch auf anderen Trägern aufgebracht werden, wie Mikrotiter-Platten, Kügelchen oder Mikrokugeln. Verfahren zum Verknüpfen von Nucleinsäuren mit geeigneten Trägern und die Träger selbst sind z. B. beschrieben in den US-Patenten Nr. 5,981,956; 5,922,591; 5,994,068 (Flow-thru-Chip-Ö Probe Arrays-Ö der Gene Logic); 5,858,659; 5,753,439; 5,837,860 und die FlowMetrix-Technologie (z. B. Mikrokugeln) von Luminex (US-Patente Nr. 5,981,180 und 5,736,330).

[0079] Die Nucleinsäuren, die die Polymorphismen von den LQT- und Cytochrom-P450-Genen erkennen, können insbesondere mit einem einzelnen Träger verbunden sein. Alternativ kann, in dem Fall von Mikrokugeln, der Träger nur eine einzelne oder ein Paar (z. B. 2, 3, 4, 5 oder 10) Nucleinsäuren aufweisen und kann mit Mikrokugeln, enthaltend verschiedene Nucleinsäuren, gemischt werden.

[0080] Es gibt zwei bevorzugte Verfahren, um ein Nucleinsäure-Array herzustellen. Eines ist die Herstellung der spezifischen Oligonukleotid-Sequenzen direkt auf der festen Phase in der gewünschten Probe (Southern et al., Nucl. Acids Res. 22: 1368–73 (1994); Maskos et al., Nucl. Acids Res. 20: 1679–84 (1992); Pease et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 5022–6 (1994) und US-Patent Nr. 5,837,860) und das andere ist die Vorsynthese der Oligonukleotiden in einem automatisierten DNA-Synthesizer und anschließend das Verknüpfen der Oligonukleotiden auf der Auflage der festen Phase an spezifischen Stellen (Lamtire et al., Nucl. Acids Res. 22: 2121–5 (1994) und Smith et al., Nucl. Acids Res. 22: 5456–64 (1994)). Bei dem ersten Verfahren beeinflusst die Effizienz des Kopplungsschrittes jeder einzelnen Base die Qualität und Vollständigkeit des Nucleinsäure-Molekül-Arrays.

[0081] Ein zweites, besonders bevorzugtes Verfahren für die Synthese eines Nucleinsäure-Arrays verwendet einen automatisierten DNA-Synthesizer für DNA-Synthesen. Die kontrollierte Chemie eines automatisierten DNA-Synthesizers erlaubt die Synthese von längeren DNA-Molekülen höherer Qualität, als es bei dem ersten Verfahren möglich ist. Außerdem können die synthetisierten Nucleinsäure-Moleküle vor dem Kopplungsschritt aufgereinigt werden. Die Nucleinsäuren können auf dem Träger, wie in US 5,837,860 beschrieben, aufgebracht werden.

A. Hybridisierungs-Nachweis von PCR-Produkten

[0082] Auf diese Weise können z. B. kovalent immobilisierte Nucleinsäure-Moleküle verwendet werden, um spezifische PCR-Produkte durch Hybridisierung nachzuweisen, wobei die Fang-Probe auf der festen Phase oder auf dem Träger immobilisiert ist (Ranki et al., Gene 21: 77–85 (1983); Keller et al., J. Clin. Microbiol. 29: 638–41 (1991); Urdea et al., Gene 61: 253–64 (1987)). Ein bevorzugtes Verfahren wäre die Herstellung eines Einzelstrang-PCR-Produkts vor der Hybridisierung. Eine Patientenprobe, die unter Verdacht steht, das Ziel-Molekül oder ein Amplifikationsprodukt hiervon zu enthalten, würde dann der festen Oberfläche ausgesetzt und könnte mit dem gebundenen Oligonukleotid hybridisieren.

[0083] Die Verfahren der vorliegenden Erfindung setzen nicht voraus, dass die Ziel-Nucleinsäure nur einen von seinen natürlichen zwei Strängen enthält. Daher können die Verfahren der vorliegenden Erfindung entweder auf Doppel-Strang-DNA (dsDNA) oder auf Einzelstrang-DNA (ssDNA), erhalten durch zum Beispiel alkalische Behandlung von nativer DNA, angewendet werden. Die Anwesenheit von dem ungenutzten (nicht Templat-)Strang beeinflusst die Reaktion nicht.

[0084] Wenn gewünscht, kann allerdings jede Änderung des Verfahrens verwendet werden, um einen der beiden natürlichen Stränge des Ziel-DNA-Moleküls von der Reaktion auszuschließen. Einzelstrang-DNA-Moleküle können erzeugt werden mittels des ssDNA-Bakteriophagus, M13 (Messing et al., Meth. Enzymol. 101: 20–78 (1983); siehe auch, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Gold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)).

[0085] Einige alternative Verfahren können verwendet werden, um Einzelstrang-DNA-Moleküle zu generieren. Zum Beispiel beschreiben Gyllensten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7652–6 (1988) und Mihovilovic et al., Bio-Techniques 7: 14–6 (1989) ein Verfahren, genannt "asymmetrische PCR", in welchem das Standard-"PCR"-Verfahren unter Verwendung von Primern, die in verschiedenen molaren Konzentrationen vorliegen, durchgeführt wird.

[0086] Andere Verfahren haben ebenfalls die Nuklease-resistenten Eigenschaften von Phosphorothioat-Derivaten ausgenutzt, um Einzelstrang-DNA-Moleküle zu generieren (US-Patent Nr. 4,521,509); Sayers et al., Nu-

cl. Acids Res. 16: 791–802 (1988); Eckstein et al., Biochemistry 15: 1685–91 (1976) und Ott et al., Biochemistry 26: 8237–41 (1987); und Sambrook et al., 1989).

C. Screenen der Polymorphismen

[0087] Das Screenen der Polymorphismen in Proben von genomischem Material gemäß der Verfahren der vorliegenden Erfindung wird in der Regel ausgeführt mittels Arrays von Oligonukleotiden-Proben. Diese Arrays können in der Regel „gekachelt“ werden für eine große Anzahl von spezifischen Polymorphismen. "Kacheln" bedeutet in der Regel die Synthese eines definierten Sets von Oligonukleotiden-Proben, welches aus einer zu der Ziel-Sequenz von Interesse komplementären Sequenz aufgebaut ist, sowie vorgewählte Variationen dieser Sequenz, z. B. Substitution von einer oder mehreren gegebenen Positionen mit einem oder mehreren Vertretern des Basensets der Monomere, d. h. Nukleotiden. Kachel-Strategien werden im Detail in der veröffentlichten PCT-Anmeldung WO 95/11995 diskutiert.

[0088] "Ziel-Sequenz" bedeutet eine Sequenz, welche identifiziert wurde, einen Polymorphismus oder eine Mutation (z. B. ein Einzelbasen-Polymorphismus auch als eine "biallelische Base" bezeichnet) aufzuweisen. Es versteht sich, dass der Begriff "Ziel-Sequenz" die verschiedenartigen Formen, die in einer bestimmten Probe eines genomischen Materials vorhanden sind, d. h. beide Allelen in einem Diploid-Genom, umfasst.

[0089] In einer bestimmten Erscheinungsform sind Arrays für eine Anzahl von spezifischen, identifizierten polymorphen Marker-Sequenzen gekachelt.

[0090] Insbesondere ist das Array so gekachelt, dass es eine Anzahl von Nachweisfeldern umfasst, wobei jedes Nachweisfeld spezifisch für einen spezifischen polymorphen Marker oder ein Set von polymorphen Markern ist. Zum Beispiel kann ein Nachweisfeld gekachelt sein, um eine Anzahl von Proben, welche sich über das Sequenz-Segment, das einen spezifischen Polymorphismus umfasst, erstreckt, zu umfassen. Um Proben, die komplementär zu jeder Variante sind, zu gewährleisten, werden die Proben paarweise synthetisiert, wobei sie sich zum Beispiel in der biallelischen Base unterscheiden.

[0091] Zusätzlich zu den sich in biallelischen Basen unterscheidenden Proben können monosubstituierte Proben in der Regel innerhalb des Nachweisfeldes gekachelt werden. Diese monosubstituierten Proben haben Basen auf und entlang einer bestimmten Anzahl von Basen in jeder Richtung von dem Polymorphismus, substituiert mit den restlichen Nukleotiden (ausgewählt aus A, T, G, C oder U). Typischerweise werden die Proben in einem gekachelten Nachweisfeld Substitutionen von Sequenzpositionen aufweisen bis zu und einschließlich jenen, die fünf Basen von der Base, die dem Polymorphismus entspricht, entfernt sind. Vorzugsweise werden Basen bis zu und einschließlich jenen in Position 2 Basen von dem Polymorphismus substituiert. Die monosubstituierten Proben liefern interne Kontrollen für den gekachelten Array, um die aktuelle Hybridisierung von der artifiziellen Kreuz-Hybridisierung zu unterscheiden.

[0092] Eine Auswahl an gekachelten Konfigurationen kann auch angewendet werden, um eine optimale Abgrenzung von perfekt hybridisierten Proben zu gewährleisten. Zum Beispiel kann ein Nachweisfeld gekachelt werden, um eine optimale Hybridisierungsstärke mit minimaler Kreuz-Hybridisierung zu liefern. Zum Beispiel, wenn eine Sequenz downstream einer polymorphen Base G-C-reich ist, kann es bei der Analyse möglicherweise zu einem erhöhten Level an Kreuz-Hybridisierungen oder "Verzerrung" kommen. Dementsprechend kann man das Nachweisfeld kacheln, um den Vorteil eines größeren Teils der upstream-Sequenz zu nutzen.

[0093] Optimal gekachelte Konfigurationen können für jeden bestimmten Polymorphismus durch Vergleichsanalyse bestimmt werden. Zum Beispiel können Triplet oder größere Nachweisfelder leicht angewendet werden, um solche optimale Kachel-Strategien auszusuchen.

[0094] Zusätzlich werden Arrays in der Regel gekachelt, um ein einfaches Lesen und Analysieren zu gewährleisten. Zum Beispiel werden die mit einem Nachweisfeld gekachelten Proben in der Regel so angeordnet, dass beim Lesen entlang des Nachweisfeldes die Proben hintereinander gekachelt sind, d. h. jeweils ein oder mehrere Nukleotiden entlang der Ziel-Sequenz.

[0095] Sobald ein Array für einen bestimmten Polymorphismus oder Set von Polymorphismen (z. B. LQT- und Cytochrom-P450-Gene) entsprechend gekachelt ist, wird die Ziel-Nucleinsäure mit dem Array hybridisiert und gescannt. Hybridisierung und Scannen werden in der Regel durch Verfahren durchgeführt, wie sie z. B. in den PCT-Anmeldungen WO 92/10092 und WO 95/11995, und dem US-Patent Nr. 5,424,186 beschrieben sind. Kurz gesagt, wird eine Ziel-Nucleinsäure-Sequenz, welche einen oder mehrere voridentifizierte polymorphe(n)

Marker umfasst, über bekannte Amplifikations-Verfahren, z. B. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), vervielfältigt. Üblicherweise schließt dies die Verwendung von Primer-Sequenzen ein, die komplementär zu den Strängen der Ziel-Sequenz sowohl upstream und downstream des Polymorphismus' sind. Asymmetrische PCR-Verfahren können ebenfalls angewendet werden. Das vervielfältigte Ziel, welches in der Regel eine Markierung enthält, wird dann mit dem Array unter geeigneten Bedingungen hybridisiert. Nach Beendigung der Hybridisierung und dem Waschen des Arrays, wird der Array gescannt um die Position auf dem Array, auf welchem die Ziel-Sequenz hybridisiert hat, zu bestimmen. Die von dem Scan erhaltenen Hybridisierungsdaten liegen üblicherweise in der Form von Fluoreszenz-Stärken als Funktion des Ortes auf dem Array vor.

[0096] Obwohl bei der bevorzugten Ausführungsform vornehmlich hinsichtlich eines Einzel-Nachweisfeldes, z. B. für die Ermittlung eines Einzelpolymorphismus', beschrieben, werden die in dem Verfahren der Erfindung verwendeten Arrays multiple Nachweisfelder umfassen und somit in der Lage sein, multiple, spezifische Polymorphismen zu analysieren. Zum Beispiel umfassen bevorzugte Arrays in der Regel von ungefähr 50 bis ungefähr 4000 verschiedene Nachweisfelder, wobei besonders bevorzugte Arrays von 10 bis 3000 verschiedene Nachweisfelder umfassen.

[0097] Bei wechselnden Anordnungen wird in der Regel vorausgesetzt, dass die Nachweisfelder innerhalb eines einzelnen Arrays oder in multiplen, getrennten Arrays angeordnet sein können, so dass wechselnde, optimale Bedingungen während der Hybridisierung des Ziels auf dem Array verwendet werden können. Zum Beispiel kann es oft gewünscht sein, die Ermittlung derjenigen Polymorphismen, die in G-C-reiche-Strecken einer genomischen Sequenz fallen, separat von jenen, die in A-T-reiche-Segmente fallen, durchzuführen. Dies erlaubt die getrennte Optimierung der Hybridisierungs-Bedingungen für jede Situation.

[0098] Zusätzliche Verfahren zur Ermittlung von Genmutationen umfassen die Verfahren beschrieben in den internationalen PCT-Anmeldungen WO 99/42622; WO 99/29901; WO 98/49341; WO 97/27317 und WO 97/22720.

D. Bezeichnung

[0099] Nach Hybridisierung und Scannen werden die Hybridisierungs-Daten des gescannten Arrays anschließend analysiert, um zu bestimmen, welche Variante oder Varianten der polymorphen Marker in der Probe oder Ziel-Sequenz, wie von den Proben bestimmt, zu welchen das Ziel hybridisiert, z. B. eine von den zwei homozygoten Formen oder der heterozygoten Form, vorliegt. Diese Bestimmung wird "Bezeichnung" des Genotyps genannt. Bei Bezeichnung des Genotyps handelt es sich üblicherweise um den Vergleich der Hybridisierungsdaten für jede mögliche Variante und, basierend auf diesem Vergleich, die Identifizierung der aktuellen Variante (für Homozygoten) oder Varianten (für Heterozygoten), die vorliegen. In einem Aspekt umfasst dieser Vergleich das Verhältnis der Hybridisierungs-Stärken (korrigiert für den mittleren Hintergrund-Level) für die erwarteten perfekt hybridisierten Proben für eine erste Variante gegenüber dem der zweiten Variante. Ist die Markierung für die erste Variante homozygotisch, wird dieses Verhältnis eine große Zahl sein, theoretisch nahe einem unendlichen Wert. Ist die zweite Variante homozygotisch, wird das Verhältnis eine sehr kleine Zahl sein, d. h. theoretisch nahe Null. Ist die Markierung heterozygotisch ist, wird das Verhältnis ungefähr 1 sein. Diese Zahlen sind, wie beschrieben, theoretisch. Üblicherweise wird das erste Verhältnis beträchtlich über 1 liegen, d. h. 2, 4, 5 oder größer sein. Gleichermaßen wird das zweite Verhältnis üblicherweise wesentlich weniger als 1, d. h. 0.5, 0.2, 0.1 oder weniger, sein. Das Verhältnis für Heterozygoten wird üblicherweise ungefähr gleich 1, d. h. von 0.7 bis 1.5, sein. Diese Verhältnisse können aufgrund der spezifischen Sequenzen rund um den Polymorphismus variieren und können basierend auf einer Standard-Hybridisierung mit einer Kontrollprobe, welche die Variante des Polymorphismus enthält, eingestellt werden.

[0100] Die Qualität einer festgelegten Bezeichnung für einen bestimmten Genotyp kann ebenfalls geprüft werden. Zum Beispiel kann die maximale perfekt passende Intensität geteilt werden durch eine Messung der Hintergrundgeräusche (welche durch die Standardabweichung der falsch angepassten Intensität dargestellt werden kann). Überschreitet das Verhältnis einige vorgewählte Schnittstellen, wird die Bezeichnung als gut befunden. Zum Beispiel, wenn die maximale Intensität der erwarteten perfekten Kompatibilität des Verzerrungslevels zweifach übersteigt, kann es als eine gute Bezeichnung bezeichnet werden. Weitere Beschreibung von Software, die für die genetische Bezeichnung verwendet wird, kann wie im US-Patent Nr. 5,858,659 beschrieben verwendet werden.

E. Verfahren zur Identifizierung neuer Polymorphismen

[0101] Ein anderer Aspekt ist die Identifizierung von Polymorphismen oder Mutationen, welche mit oder indi-

rekt involviert mit QT-Intervallverlängerungen verbunden sind. Diese Polymorphismen oder Mutationen befinden sich in wenigstens zwei Gen-Klassen (z. B. LQT-Gene, veränderte Empfindlichkeitsgene oder erhöhte Expositionsgene). Außerdem können Mutationen oder Polymorphismen jene sein, welche vorher identifiziert, aber nicht mit QT-Intervallverlängerung in Verbindung gebracht wurden. Sobald neue Mutationen oder Polymorphismen identifiziert werden, können diese alternativ ebenfalls mittels der hier beschriebenen Untersuchungen untersucht werden, um zu bestimmen, ob die "neue Mutation" und/oder "Polymorphismus" QT-Intervallverlängerungen verursachen kann. Da neue Polymorphismen und Mutationen identifiziert werden, können die Nucleinsäuren, welche diese Polymorphismen erkennen, dem Nucleinsäure-Array für das Screenen von Personen zugegeben werden. Ein Verfahren zur Identifizierung solcher "neuer" Polymorphismen ist, biologische Proben von Personen zu erhalten, die erworbenes LQTS aufgrund der Verabreichung eines Arzneimittels oder Arzneimitteln erfahren haben, und die LQT-Gene oder P450-Gene zu sequenzieren, um den Polymorphismus, welcher für die unerwünschte Reaktion auf Arzneimittel verantwortlich ist, zu isolieren.

[0102] Für bekannte Mutationen und Polymorphismen in jeder dieser Gen-Klassen, welche vorher mit unerwünschten Reaktionen auf Arzneimittel verbunden wurden, können alternativ die Arzneimittel auf ihre Fähigkeit, das QT-Intervall wie diskutiert zu verlängern, untersucht werden.

IV. Verfahren zur Identifizierung von Wirkstoffen, welche verlängerte Repolarisation induzieren

[0103] Verfahren zur Identifizierung von Wirkstoffen, welche QT-Intervalle verlängern, können, wie in den unten angegebenen Beispielen beschrieben, durchgeführt werden. Alternativ können Wirkstoffe mittels des Langendorff-Verfahrens in, z. B., isolierten perfusionierten Kaninchenherzen oder dem Whole-Cell-Patch-Clamp-Verfahren in ventrikulären Myozyten untersucht werden, um den TdP-Unterschied zu untersuchen. Liu et al., J. Cardiovasc. Pharmacol. 34: 287–94 (1999) und Ebert et al., J. Womens Health 7: 547–57 (1998) verwendeten diese Verfahren zur Untersuchung der geschlechtsspezifischen Unterschiede von Torsades de Pointes (TdP) zwischen Männern und Frauen. Drici et al., J. Cardiovasc. Pharmacol. 34: 82–8 (1999) verwendeten isolierte Langendorff-perfusionierte Kaninchenherzen, um den Einfluss des Wirkstoffes Tegaserod (HTF 919) auf die kardiale Repolarisation zu testen. Perfusionierte (Langendorff) Herzen von Katzen können ebenfalls verwendet werden, wie beschrieben in Wang et al., J. Cardiovasc. Pharmacol. 32: 123–8 (1998), in der die Autoren das Modellsystem verwendeten, um QT-Verlängerungen in Reaktion auf die Verabreichung von Antihistaminikum zu untersuchen. Das Whole-Cell-Patch-Clamp-Verfahren wurde verwendet, um den Einfluss von Tamoxifen auf den verzögerten Gleichrichter (I_{Kr}), den Einwärtsgleichrichter (I_{K1}), den transienten Auswärts-Strom (I_{to}) und den Einwärts-L-Typ-Kalzium-Strom (I_{Ca}) in ventrikulären Myozyten von Kaninchen zu studieren (Liu et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 287: 877–83 (1998)).

[0104] Zusätzlich zu den obigen in vitro Verfahren, kann die Ermittlung des Einflusses einer bestimmten Verbindung auch mittels eines Elektrokardiogramms (EKG) durchgeführt werden, um die Pharmakinetiken eines Arzneimiteleinflusses auf QTC-Verlängerungen zu studieren (siehe z. B. Sale et al., Clin. Pharmacol. Ther. 56: 295–301 (1994)).

[0105] Verfahren zur Messung von Kalium(K^+)-Strömen in ATI-Zellen und in Oocyten sind in der Fachwelt bekannt und können mittels der, z. B., durch Yang et al., Circulation 91: 1799–1806 (1995) und Driga et al., Biophysics J. 74: A210 (1998) beschriebenen Verfahren durchgeführt werden. Grundsätzlich werden die Zellen mit einer Nucleinsäure mit der vermeintlichen Mutation transfiziert, von welcher man glaubt, dass sie QT-Verlängerungen verursacht, wenn sie einem Wirkstoff, welcher dafür bekannt ist, QT-Verlängerungen zu verursachen, ausgesetzt wird. Die I_{Kr} und I_{Ks} , und sogar die I_{to} -Reaktionen werden gemessen und verglichen mit einer Zelle, welche das normale Wildtyp-Gen exprimiert. Dies kann ebenfalls beim Testen von Na^+ -Stromveränderungen gemacht werden.

[0106] Der Einfluss der genetischen Mutationen kann auch mittels spannungssensitiver Färbeverfahren untersucht werden. Das Untersuchen von Veränderungen der Zellspannung unter Verwendung von Farbstoffen ist in der Fachwelt bekannt. Siehe z. B. Morley et al., J. Cardiovasc. Electrophysiol. 10: 1361–75 (1999) und Dillon et al., Science 214: 453–6 (1981).

[0107] Die folgenden Beispiele werden angeführt, um die Ausführungsformen der Erfindung zu veranschaulichen und sollen nicht als Einschränkung des Umfangs der Erfindung angesehen werden.

BEISPIELE

Beispiel 1

Verfahren und Kit zur Ermittlung der Neigung einer Person zu unerwünschten Reaktionen auf Tamoxifen

[0108] Die Stoffwechselwege von Tamoxifen sind komplex und wurden umfangreich studiert. Der Tamoxifen-Metabolismus umfasst multiple Wege, und die primären und sekundären Metaboliten haben verschiedene pharmakologische Wirksamkeiten mit bestimmten Metaboliten, welche beträchtliche interindividuelle Schwankungen verursachen. In vitro- und in vivo-Studien in Menschen haben gezeigt, dass die Hauptstrecken des Tamoxifenmetabolismus N-Demethylierung, N-Oxidation und 4-Hydroxylierung umfasst (Buckley et al., *Drugs* 37: 451–90 (1989) und Lim et al., *Carcinogenesis* 15: 589–93 (1994)). Tamoxifen-N-Demethylierung, welche mengenmäßig der wichtigste Weg zu sein scheint, wird hauptsächlich katalysiert durch CYP3A (Jacolot et al., *Biochem. Pharmacol.* 41: 1911–9 (1991); Mani et al., *Drug Metab. Dispos.* 21: 645–56 (1993)). Allerdings scheint CYP2D6 ebenfalls ein Hauptenzym zu sein, das die Tamoxifen-4-Hydroxylierung katalysiert (Crewe et al., *Biochem. Pharmacol.* 53: 171–8 (1997)).

[0109] Verfahren zur DNA-Extraktion. Blut wird von einer Person z. B. Menschen, in Natrium-Heparin-Vacutainer (Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ) abgezapft und anschließend in 5,0 ml kryogene Fläschchen von Corning (Corning; Cambridge, MA) überführt. Das Blut wird in einem nicht frostfreien –20°C Gefrierschrank bis zur Verwendung eingefroren.

[0110] Reagenzien, welche verwendet werden, um die DNA aus dem ganzen Blut zu extrahieren, sind das QIAGEN Blood Midi Kit®, sofern nicht anders angegeben. 200 µl der QIAGEN Protease werden einem 15 ml Zentrifugegefäß zugegeben. Das Blut wird aufgetaut und 2,0 ml werden dem Gefäß zugegeben, gefolgt von 2,0 ml vom Puffer AL. Das Gefäß wird verschlossen und die Inhalte werden mit einem Vortexer für 15 Sekunden gemischt. Nach dem Mischen werden 2 ml von 95% Ethanol zugegeben und die Inhalte durch Umkehrung gemischt. Die Inhalte des Gefäßes werden anschließend auf eine QIAGEN Midi Spin Säule, die in ein Auffangröhrchen gestellt wird, gegeben. Die Säule und das Auffanggefäß werden bei 6,000 × g bei 4°C für 2 Minuten zentrifugiert. Anschließend wird das Auffanggefäß verworfen und durch ein neues Auffanggefäß ersetzt. 2 ml des Puffers AW werden auf die Spinsäule gegeben und die Säule wird erneut bei 6,000 × g bei 4°C für 2 Minuten zentrifugiert. Die Säule wird erneut gespült, indem das Auffanggefäß verworfen, dieses durch ein neues Auffanggefäß ersetzt, 2,0 ml des Puffers AW auf die Spinsäule gegeben und bei 6,000 × g bei 4°C für 2 Minuten zentrifugiert wird. Das verwendete Auffanggefäß wird verworfen und durch ein neues Auffanggefäß ersetzt. Die DNA wird von der Säule eluiert durch Zugabe auf die Spinsäule von 1 ml Elutions-Puffer, durch Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Minute und anschließend durch Zentrifugieren bei 6,000 × g bei 4°C für 2 Minuten. Die DNA wird überführt in ein Sarstedt 2,0 ml Gefäß mit Schraubverschluss (#72730006, Sarstedt; Newton, NC) und gefroren bei –20°C.

[0111] Die DNA-Konzentration wird durch Verwendung des 260/280 Verfahrens in einem Spektrometer gemessen und die DNA Konzentration mit Wasser auf 60 ng/µl eingestellt.

[0112] Die DNA eines bukkalen Abstrichs wird wie folgt erhalten. Bukkale Zellen werden erhalten durch sanftes Reiben eines sterilen Baumwolltupfers in dem Mund der Person. Der Tupfer wird in ein Falcon 2063 Gefäß eingebracht und 1,5 mls von 1X PBS werden zugegeben, gemischt und zentrifugiert bei 3K für 5 Minuten, um die Zellen niederzuschlagen. Der Überstand wird entfernt und dieser Vorgang mit einem weiteren 1 ml 1X PBS wiederholt. Der Zellniederschlag wird anschließend in 47 µl PCR-Lysis-Puffer (Promega PCR Puffer B und 10 mg/ml Proteinase K) suspendiert. Proben werden für 30 Minuten bei 60°C inkubiert und die Reaktion durch Sieden der Probe für 10 Minuten gestoppt. Die Probe wird anschließend zentrifugiert bei 3K für 5 Minuten und bis zur Verwendung bei –20°C gelagert.

[0113] CYP2D6 und CYP2C19 Gentypisierung unter Verwendung des Affymetrix P450 GeneChip®. Reagenzien, die in diesem Protokoll verwendet werden, benutzen das Affymetrix P450 GeneChip Kit®, sofern nicht anders angegeben. Die Reaktionsmassenmischung wird hergestellt in einem Templatfreien Bereich durch Kombination des Folgenden:

Tabelle 4

PCR Amplifikation		
	Pro Reaktion	Endkonzentration
H ₂ O	23 µl	
Affymetrix CYP450 Primer Mischung	4 µl	200 µM
20% DMSO	5 µl	2.0%
2.0 mM dNTP Mischung	5 µl	200 µM
AmpliTaQ Gold® PCR Puffer	5 µl	1X
25 mM MgCl ₂	5 µl	2.5 mM
5 U/µl AmpliTaQ Gold® Polymerase	1 µl	5 U

Tabelle 5

Primer		
CYP 2D6	Upstream Primer	Downstream Primer
Exon 1/2	5'- CAGAGGAGCCCATTTGGTAG TG AGGCAGGT-3'	5'- GGTCCCACGGAAATCTGTCTC TGT-3'
Exon 3/4	5'- CACGCGCACGTGCCCCGTCCC A-3'	5'- CTCTCGCTCCGCACCTCGCGC AGA-3'
Exon 5/6	5'- GGACTCTGTACCTCCTATCC ACG TCA-3'	5'- CCTCGGCCCTGCACTGTTTC CCA GA-3'
Exon 7/7	5'- GGCGACCAGAGATGGGTGAC CA GGCTC-3'	5'- GCGCCAGGCCTACCTTAGGGA TG CGGGA-3'
Exon 8/9	5'- GGGAGACAAACCAGGACCT GC CAGA-3'	5'- CATCTGCTCAGCCTCAACGTA CC CCTGTCT-3'

[0114] Die benötigte Anzahl von Micro-Amp® 8-Reihen Reaktionsgefäßen wird in einen 96-Näpfchen-Gefäß/Tablett-Halter gestellt und der Aufbau wird in eine MicroAmp® Basis (alles Perkin-Elmer; Foster City, CA) gestellt. Fünfundvierzig µl der Massenmischung werden in die 0,2 ml MicroAmp Gefäße aufgeteilt und die Gefäße werden verschlossen. Diese Gefäße werden dann in einen mittleren Templatbereich überführt, um die DNA zuzugeben.

[0115] Fünf µl DNA (60 ng/µl) werden jedem Probengefäß zugegeben; 5 µl Affymetrix CYP450 Referenz-DNA werden dem positiven Kontrollgefäß zugegeben; und 5 µl Wasser werden dem negativen Kontrollgefäß zugegeben. Die Gefäße werden anschließend verschlossen und das Gestell in einer Tischzentrifuge bei 2,000 rpm für 1 Minute zentrifugiert.

[0116] Die Proben werden anschließend in einen Perkin-Elmer GeneAmp®PCR System 9600 Thermozykler gestellt, programmiert auf: 95°C für 5 Minuten, anschließend 15 Zyklen von 95°C/40 Sekunden, 65°C/50 Se-

kunden, 72°C/50 Sekunden gefolgt von 30 Zyklen von 95°C/30 Sekunden, 65°C/50 Sekunden, 72°C/50 Sekunden zuzüglich eine Sekunde pro Zyklus, anschließend eine Verlängerung bei 72°C für 7 Minuten.

[0117] Ein 10 µl Aliquot von jedem Produkt wird auf eine 2% Agarose beladen (mit beladenem Puffer). Das Gel wird laufengelassen bis der Bromphenolblaustreifen 2/3 der Gelstrecke gelaufen ist und auf einem UV-Transilluminator fotografiert. Einwandfrei vervielfältigte Produkte erscheinen als Banden von 159, 171, 250, 444, 762, 878 und 1,125 Basenpaaren. Alle Streifen müssen vorhanden sein, um beide CYP2D6 und CYP2C19 Bezeichnungen zu erhalten. Das Fehlen der zwei breiteren Banden zur Amplifikation schließen jede CYP2D6 Bezeichnung aus. Wenn alle Streifen vorhanden sind, wird anschließend der nächste Schritt die Fragmentierung sein.

[0118] Fragmentierung. Ein sauberes Reaktionsgefäß-Gestell wird mit einem Gefäß für jede Probe, die fragmentiert werden soll, auf Eis gestellt. Alle Reagenzien für die Fragmentationsmassenmischungen werden auf Eis gehalten und die Massenmischung durch die Kombination der Reagenzien, wie in Tabelle 6 angewiesen, hergestellt.

Tabelle 6

	25 µl Massenmischung	250 µl Massenmischung
Fragmentierungsreagenz	1 µl	2 µl
20 mM EDTA	1 µl	2 µl
1 U/µl alkalische Phosphatase	1 µl	2 µl
Wasser	110.5 µl	221 µl

[0119] 125 µl Massenmischung für 1–25 Reaktionen. 250 µl Massenmischung für 25–50 Reaktionen. Fünf µl der Fragmentierungsmassenmischung werden jedem Gefäß (auf Eis) zugegeben und 10 µl PCR Produkt werden den Gefäßen zugegeben. Die Gefäße werden verschlossen und entweder wird das Gestell kurz gegen eine Bank geklopft oder schnell bei 4°C zentrifugiert, um die Komponenten zusammenzubringen. Das Gestell wird anschließend in einen Perkin-Elmer GeneAmp® PCR System 9600 Thermozykler gestellt und das 25°C/20 Minuten, 95°C/10 Minuten, 4°C konstant Fragmentierungsprogramm wird durchlaufen.

[0120] Markierung. Die Markierungshauptmischung wird wie folgt durch Kombination der Reagenzien in einem Mikrozentrifugegefäß hergestellt:

Tabelle 7

	Pro Reaktion	am Ende
Terminale Transferase Puffer	4 µl	1X
Fluorescein N6-ddATP	0,5 µl	25 µM
20 U/µl Terminale Transferase	0.5 µl	10 U

[0121] Fünf µl der Markierungshauptmischung werden zu jedem Gefäß des Fragmentierungsproduktes gegeben und das Gestell wird in einen Perkin-Elmer GeneAmp® PCR System 9600 Thermozykler gestellt und das 37°C/35 Minuten, 95°C/5 Minuten, 4°C konstant Markierungsprogramm wird durchlaufen.

[0122] Vorbereitung zur Hybridisierung. Die folgenden Lösungen werden hergestellt gemäß der Anleitung in der Affymetrix® GeneChip® CYP450 Bedienungsanleitung:

Hybridisierungskonzentrat:

5.5 X SSPE, 0.055% Triton® X-100 und 1.1 mM CTAB
(Hexadecyltrimethylammoniumbromid, Sigma H-6269; St. Louis, MO)

Hybridisierungshauptmischung:

[0123] Man kombiniere 45,5 ml Hybridisierungskonzentrat, 1 ml Wasser mit molekularem Biologiestandard, 1 ml

50X Denhardt's Lösung und 500 µl Affymetrix® Kontrolloligonukleotid F1. Man gebe 480 µl Aliquote in 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock Mikrozentrifugengefäße und friere bei –20°C ein (die Kombination von Denhardt's Lösung und CTAB kann Hintergrund verursachen. In dem Fall ersetzt man das Wasser mit molekularem Biologiegrad für die Denhardt's Lösung).

[0124] Hybridisierung. Zwanzig µl des fragmentierten und markierten PCR Produkts werden zu einem Gefäß mit Hybridisierungshauptmischung gegeben und mit der Probe markiert. Die Gefäße werden für 10 Minuten in siedendes Wasser gestellt und anschließend umgehend auf Eis gegeben. Die Gefäße werden für mindestens 10 Minuten auf Eis gehalten. Während die Gefäße auf Eis sind, wird die Affymetrix® Fluidics Station gewässert. Man wasche Puffer A (3X SSPE, 0,005% Triton X-100 und 1 mM CTAB) und man wasche Puffer B (6X SSPE).

[0125] Ein CYP450 Proben-Array wird in das Fluidics Station Modul gestellt und eines der Hybridisierungshauptmischungen/DNA Gefäße in das untere Fach gestellt. Das CYP450 Hybridisierungsprotokoll wird in der Fluidics Station ausgeführt.

[0126] Scannen und Analyse. Der hybridisierte Chip wird von der Fluidics Station zum Scanner überführt. Ein Scannprotokoll wird dann auf den Chip, wie durch Affymetrix® angeleitet, ausgeführt. Nachdem der Scann beendet ist, wird das Analyseprogramm durchlaufen und der Bericht vorbereitet. Die Ergebnisse werden in eine geeignete Datenbank eingegeben.

[0127] Konventionelle CYP2D6*4 Untersuchung, Amplifikation. Fünf µl DNA (60 ng/µl) werden zu 20 µl der PCR Reaktionsmischung enthaltend 1X PCR Puffer B (Promega; Madison, WI) [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1.0% Triton X-100] gegeben; 25 pmol von jedem Primer, 200 µM von jedem dNTP, 1.5 mM MgCl₂ und 0.75 U von Taq Polymerase (Promega; Madison, WI) in 500 µl PCR Reaktionsgefäßen. Fünfundzwanzig µl Mineralöl wird auf jedes Reaktionsgefäß gegeben. Die verwendeten Primer sind jene von Heim et al., Metho. Enzymol. 206: 173–83 (1991): 5'-TGC CGC CTT CGC CAA CCA CT-3' upstream und 5'-GTG CGG AGC GAG AGA CCG AGG-3' downstream. Die Gefäße werden kurz in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert und in einen Perkin-Elmer® Modell 480 Thermozykler gestellt. Das verwendete Amplifikationsprogramm ist 2 Minuten bei 94°C Denaturierung; 35 Zyklen von 1 Minute bei 94°C; 1 Minute bei 63°C; 1 Minute bei 72°C; mit einer finalen Verlängerung von 4 Minuten bei 72°C.

[0128] Restriktionsenzym-Auflösung. Eine Massenmischung enthaltend 2 µl von BstNI (NEB; Beverly, MA), 3 µl von NEB Puffer 2 und 0,3 µl von 100X BSA pro Reaktion wird hergestellt und 5,3 µl werden zu jedem Reaktionsgefäß zugegeben. Die Gefäße werden kurz in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert, um die Restriktionsenzymmischung unter das Mineralöl zu bekommen, und bei 60°C für wenigstens 4 Stunden inkubiert.

[0129] Gelelektrophorese. Die Proben werden einer Elektrophorese auf einem 2,0% Agarosegel unterzogen. Wildtyp-Allele weisen 110 und 182 Basenpaarfragmente auf. Der *4 Mutant weist ein 292 Basenpaarfragment auf und ein Heterozygot zeigt 110, 182 und 292 Basenpaarbanden auf dem Gel.

Konventionelle CYP2D6*10 Untersuchung.

[0130] Amplifikation. Die Untersuchung, die für CYP2D6*10 verwendet wird, ist ein Verfahren von zwei Amplifikationen der allelenspezifischen Oligonukleotide.

[0131] Amplifikation 1. Fünf µl DNA (60 ng/µl) werden zugegeben zu 45 µl PCR Reaktionsmischung enthaltend 1X PCR Puffer B (Promega; Madison, WI) [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1.0% Triton X-100] gegeben; 25 pmol von jedem Primer, 200 µM von jedem dNTP, 1.5 mM MgCl₂ und 0.75 U von Taq Polymerase (Promega; Madison, WI) in 200 µl PCR Gefäßreihen. Die verwendeten Primer sind: 5'-ACC AGG CCC CTC CAC CGG-3' upstream (Primer 9) und 5'-TCT GGT AGG GGA GCC TCA GC-3' downstream (Primer 10). Das Gefäßgestell wird kurz in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und in einen Perkin-Elmer® Modell 9600 Thermozykler gestellt, welches programmiert ist, 4 Minuten bei 94°C Denaturierung; 35 Zyklen von 1 Minute bei 94°C; 1 Minute bei 58°C; 1 Minute bei 72°C; mit einer programmierten finalen Verlängerung von 4 Minuten bei 72°C zu durchlaufen.

[0132] Amplifikation 2. Zwei Massenmischungen werden für jede Probe gemacht. Die Wildtyp-Massenmischung enthält die Primer 9 und 11 (Primer 11 ist 5'-CCA CCA GGC CCC CT-3') und die Mutantmassenmischung enthält die Primer 9 und 12 (5'-GCA CCA GGC CCC GT-3'). Bei beiden Massenmischungen werden 3 µl des Produkts aus der ersten Amplifikation zugegeben zu 47 µl PCR Reaktionsmischung enthaltend 1X PCR Puffer B (Promega; Madison, WI) [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1.0% Triton X-100]; 25 pmol von jedem

Primer, 200 µM von jedem dNTP, 1.5 mM MgCl₂ und 0.75 U von Taq Polymerase (Promega; Madison, WI) in 200 µl PCR Gefäßreihen. Das Gefäßgestell wird kurz in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und in einen Perkin-Elmer® Modell 9600 Thermozykler gestellt, welcher programmiert ist, die 4 Minuten bei 94°C Denaturierung; 35 Zyklen von 1 Minute bei 94°C; 1 Minute bei 52°C; 1 Minute bei 72°C; mit einer programmierten finalen Verlängerung von 4 Minuten bei 72°C zu durchlaufen.

[0133] Gelelektrophorese. Die Proben werden in Paaren (Wildtyp und Mutant) einer Elektrophorese auf einem 2,0% Agarosegel unterzogen. Wildtyp-Allele ergeben nur mit der Wildtyp-Reaktionsmischung ein 516 bp Produkt. Das *10 Mutant Allel ergibt nur mit der Mutant-Reaktionsmischung ein 516 bp Produkt. Ein Heterozygot ergibt Produkte mit beiden Mischungen.

[0134] Konventionelle CYP2C9 144 Untersuchung, Amplifikation. Fünf µl DNA (60 ng/µl) werden zugegeben zu 20 µl einer PCR Reaktionsmischung enthaltend 1X PCR Puffer B (Promega; Madison, WI) [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1.0% Triton X-100]; 25 pmol von jedem Primer, 200 µM von jedem dNTP, 1.5 mM MgCl₂ und 0.75 U von Taq Polymerase (Promega; Madison, WI) in 500 µl PCR Reaktionsgefäßen. Fünfundzwanzig µl Mineralöl werden auf jedes der Reaktionsgefäße gegeben. Die verwendeten Primer sind jene von Bhasker et al., Pharmacogenetics 7: 51–8 (1997); 5'-TTC TCA AAA GTC TAT GGT-3' upstream und 5'-GCC TTG TGG AGG AGT TGA-3' downstream. Die Gefäße werden kurz in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert und in einen Perkin-Elmer® Modell 480 Thermozykler gestellt. Das verwendete Amplifikationsprogramm ist 2 Minuten bei 94°C Denaturierung; 35 Zyklen von 1 Minute bei 94°C; 1 Minute bei 50°C; 1 Minute bei 72°C; mit einer finalen Verlängerung von 4 Minuten bei 72°C.

[0135] Restriktionsenzym-Auflösung. Eine Massenmischung enthaltend 2 µl Ava II (New England Biolabs, NEB; Beverly, MA) und 3 µl NEB Puffer, 4 pro Reaktion, wird hergestellt. Jedem Reaktionsgefäß werden 5 µl zugegeben. Die Reaktionsgefäße werden kurz in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert, um die Restriktionsenzymmischung unter den Mineralölfilm zu bringen und für mindestens 4 Stunden bei 37°C inkubiert.

[0136] Gelelektrophorese. Die Proben werden einer Elektrophorese auf einem 2,0% Agarosegel unterzogen. Wildtyp-Allele ergeben 44 und 256 Basenpaarfragmente. Der 144 Mutant ergibt ein 349 Basenpaar (bp) Fragment; und ein Heterozygot weist 44, 256 und 349 bp Banden auf dem Gel auf.

Konventionelle CYP2C9 358 Untersuchung.

[0137] Amplifikation. Fünf µl DNA (60 ng/µl) werden zu 20 µl einer PCR Reaktionsmischung gegeben, enthaltend 1X PCR Puffer B (Promega; Madison, WI) [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1.0% Triton X-100]; 25 pmol von jedem Primer, 200 µM von jedem dNTP, 1.5 mM MgCl₂ und 0.75 U von Taq Polymerase (Promega; Madison, WI) in 500 µl PCR Reaktionsgefäßen. 25 µl Mineralöl werden auf jedes der Reaktionsgefäße gegeben. Die verwendeten Primer sind jene von Bhasker et al., Pharmacogenetics 7: 51–8 (1997); 5'-GTC CAG GAA GAG ATT GAT C-3' upstream und 5'-CAG AAA CTA CCT CAT CCC CAA-3' downstream. Die Gefäße werden kurz in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert und in einen Perkin-Elmer® Modell 480 Thermozykler gestellt. Das verwendete Amplifikationsprogramm ist 2 Minuten bei 94°C Denaturierung; 35 Zyklen von 1 Minute bei 94°C; 1 Minute bei 50°C; 1 Minute bei 72°C; mit einer finalen Verlängerung von 4 Minuten bei 72°C.

[0138] Restriktionsenzym-Auflösung. Eine Massenmischung enthaltend 2 µl Nsi I (NEB; Beverly, MA) und 3 µl NEB Nsi I Puffer pro Reaktion wird hergestellt und 5 µl werden zu jedem Reaktionsgefäß gegeben. Die Gefäße werden kurz in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert, um die Restriktionsenzymmischung unter den Mineralölfilm zu bekommen und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert.

[0139] Gelelektrophorese. Die Proben werden einer Elektrophorese auf einem 2,0% Agarosegel unterzogen. Wildtyp-Allele ergeben ein 181 bp Fragment. Der 358 Mutant ergibt 73 und 108 bp Fragmente. Ein Heterozygot wird mit 73, 108 und 181 bp Streifen auf dem Gel sichtbar.

Beispiel 2

In vitro Modell zum Studieren von Tamoxifen

[0140] I_{Kr} ist einer der Hauptpolarisierungsströme und seine Hemmung wurde mit TdP in Verbindung gebracht (Carlsson et al., J. Cardiovasc. Pharmacol. 16: 276–85 (1990); Roden et al., Am. Hear. J. 111: 1099–93 (1986); Woosley, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36: 233–52 (1996) und Follmer et al., Circulation 82: 289–93 (1990)). Um zu beurteilen, ob Tamoxifen einen Einfluss auf I_{Kr} hat, stellen wir erst die Anwesenheit des I_{Kr} in dem ge-

wählten Modell, ventrikulärer Myozyten des Kaninchens, sicher, unter Verwendung eines als spezifischer Hemmer für I_{Kr} bekannten Arzneimittels. Andere geeignete Modelle, wie Myozyten von Katzen oder HERG-exprimierende HEK293-Zellen können durch die Myozyten des Kaninchens ersetzt werden. **Fig. 1A** und **1B** zeigen die Membranströme ausgelöst durch ein 1,5-sekündigen Spannungs-Clamp-Schritt von -40 mV bis zu verschiedenen Test-Potentialen schwankend von -10 bis -50 mV, in derselben Zelle vor (Bild A) und nach (Bild B) 5-minütiger Exposition von $5 \mu\text{mol/L}$ E-4031, ein hoch selektiver I_{Kr} -Hemmer (Clay et al., *Biophys. J.* 69: 1830–7 (1995) und Sanguinetti et al., *J. Gen. Physiol.* 96: 195–215 (1990)). Unter kontrollierten Bedingungen floss ein relativ langsamer aktivierender Auswärts-Strom während der Depolarisierung, gefolgt von einem Auswärts-Tail-Stroms, von dem gezeigt wurde, dass er den graduellen Abfall von I_{Kr} zeigt (Follmer et al., *Circulation* 82: 289–93 (1990); Clay et al. (1995) und Sanguinetti et al. (1990)). Der initiale Peak in dem zeitabhängigen Auswärts-Strom ist auf die schnelle Aktivierung und Inaktivierung von I_{to} zurückzuführen, welcher gegenüber 4-Aminopyridin empfindlich ist. E-4031 hebt den Tail-Strom bei Repolarisierung auf und vermindert ebenfalls den zeitabhängigen Auswärts-Strom, ohne den initialen Peak (I_{to}) oder den Haltestrom (I_{K1}) zu beeinflussen. In Bild B werden die E-4031-empfindlichen Ströme gezeigt, die durch digitale Subtraktion der Ströme in den unteren Kurven von den Strömen in den oberen Kurven in Bild A erhalten werden. Verglichen mit dem Tail-Strom legte der zeitabhängige Strom merkliche Einwärts-Gleichrichtung bei einem positiveren Potential dar. I_{to} war in den E-4031-sensitiven Strömen nicht anwesend, was zeigt, dass E-4031 bei dieser Konzentration keinen Einfluss auf I_{to} hat. Superfusion mit 1 bis $2,5 \mu\text{mol/L}$ Dofetilid oder Entfernung von extrazellulärem K^+ baut ebenfalls den Tail-Strom ab (Liu et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287: 877–83 (1998)). Diese Merkmale des verzögerten Gleichrichterstroms (Einwärts-Gleichrichter des zeitabhängigen Stroms, vollständige Hemmung des Tail-Stroms durch E-4031, Dofetilid und Entfernung des extrazellulären K^+) stimmen mit der vorherigen Beschreibung von I_{Kr} in Kaninchen oder anderen Spezies überein (Clay et al. (1995); und Sanguinetti et al. (1990)).

[0141] In derselben in den **Fig. 1A** und **Fig. 1B** gezeigten Zelle wurde der I_{K1} -Strom ebenfalls vor und nach der E-4031-Exposition gemessen. **Fig. 1C** zeigt den I_{K1} -Strom ausgelöst durch eine 250 ms Hyperpolarisation zu -120 mV von einem Haltepotential von -40 mV vor und nach der E-4031-Superfusion. Ein geringer Einfluss auf den I_{K1} -Einwärts-Strom wurde beobachtet, obwohl I_{Kr} in derselben Zelle vollständig blockiert wurde. Die Auswärts-Halteströme, die die Amplitude des I_{K1} bei -40 mV vor und nach E-4031 Superfusion darstellen, waren deckungsgleich, was darauf hinweist, dass E-4031 keinen Einfluss auf den I_{K1} -Auswärts-Strom hatte.

[0142] Einfluss von Tamoxifen auf I_{Kr} , I_{to} und I_{K1} . Der Einfluss von Tamoxifen auf die drei Haupt-Kalium-Ströme wurden mittels desselben Protokolls getestet wie es für den Versuch **Fig. 1** beschrieben wurde. Gezeigt in **Fig. 2** sind die I_{Kr} , I_{to} und I_{K1} -Ströme, ausgelöst in derselben Zelle vor und nach 5-minütiger Exposition von $10 \mu\text{mol/L}$ Tamoxifen. Ähnlich wie E-4031, hob Tamoxifen den I_{Kr} -Tail-Strom auf und reduzierte auch den zeitabhängigen Strom, ohne I_{to} oder den Haltestrom (**Fig. 2A**) zu beeinflussen. Das Lösungsmittel für Tamoxifen, Ethanol, hatte keinen Einfluss auf I_{Kr} bei der zum Lösen von Tamoxifen verwendeten Konzentration ($\leq 0.1\%$ v/v). **Fig. 2B** veranschaulicht die Tamoxifen-empfindlichen Ströme, die durch digitale Subtraktion der Ströme in den unteren Kurven von den Strömen in der oberen Kurven in Bild A erhalten werden. Es gibt eine auffallende Ähnlichkeit zwischen dem Tamoxifenempfindlichen Strom und dem in **Fig. 1B** gezeigten E-4031-empfindlichen Strom. In beiden **Fig. 1B** und **Fig. 2B** veranschaulichte der zeitabhängige Strom eine starke Einwärts-Gleichrichtung bei positiveren Potentialen verglichen mit dem Tail-Strom, während I_{to} weder in dem Tamoxifen- oder in dem E-4031, empfindlichen Strom nachzuweisen war. **Fig. 2C** zeigt den I_{K1} -Strom, gemessen vor und nach 5-minütiger Exposition von $10 \mu\text{mol/L}$ Tamoxifen in derselben Zelle, wie sie in den **Fig. 2A** und **Fig. 2B** gezeigt ist. Wie E-4031 bewirkte Tamoxifen keine Inhibierung des I_{K1} -Einwärts-Stroms bei -120 mV. Tatsächlich war der I_{K1} -Einwärts-Strom etwas größer nach der Tamoxifen-Behandlung dieser Zelle (**Fig. 2C**). Die die Amplitude von I_{K1} bei 0 – 40 mV darstellenden Auswärts-Halteströme waren deckungsgleich, was darauf hinweist, dass Tamoxifen keinen Einfluss auf den I_{K1} -Auswärts-Strom hatte.

[0143] Zeitabhängige Hemmung von I_{Kr} durch Tamoxifen. **Fig. 3** beschreibt ein typisches Experiment, durchgeführt in derselben Zelle vor der Arzneimittelverabreichung (Kontrolle) oder nach 3-, 5- und 9-minütiger Superfusion mit einem $\mu\text{mol/L}$ Tamoxifen. Wie in **Fig. 3** gezeigt, ist die I_{Kr} -Hemmung durch Tamoxifen zeitabhängig und hat einen langsamen Beginn. Weitere Hemmung kann immer noch nach Superfusion für fünf Minuten beobachtet werden. Demgegenüber wurde I_{Kr} leicht von Kontroll-Myozyten (keine Exposition mit Tamoxifen aufgezeichnet) für wenigstens 10 Minuten ohne ein Zeichen von Rückgang aufgezeichnet. In der Abwesenheit des Arzneimittels betrug die 10 Minuten nach Membranbruch gemessene Amplitude von I_{Kr} $103.4 \pm 6.15\%$ derjenigen, die sofort nach Membranbruch ($n = 3$, $p > 0.05$) gemessen wurde.

[0144] Einfluss von Tamoxifen auf das I-V-Verhältnis von I_{Kr} . **Fig. 4A** und **Fig. 4B** veranschaulichen den Einfluss von 1 und $3.3 \mu\text{mol/L}$ auf das I-V (Strom-Spannung)-Verhältnis von I_{Kr} , gemessen nach 5–7-minütiger In-

fusion von Tamoxifen. Tamoxifen verringerte die I_{Kr} -Strom-Amplitude merklich in einer konzentrationsabhängigen Art und Weise. Eine typische spannungsabhängige Hemmung von I_{Kr} wird in **Fig. 4** gezeigt. Man beachte die größere Hemmung bei positiveren Potentialen. Bei dem Test-Potential von +50 mV hemmte Tamoxifen (1 und 3.3 $\mu\text{mol/L}$) I_{Kr} um $39.5\% \pm 1.7\%$ ($p < 0.01$) und $84.8\% \pm 1.3\%$ ($p < 0.01$). Keine merkliche Hemmung von I_{K1} wurde bei 3.3 $\mu\text{mol/L}$ ($5.5\% \pm 0.9\%$ Testpotential = -120 mV, $n = 4$, $p > 0.05$) beobachtet.

Beispiel 3

Vergleich der I_{Kr} -Hemmung durch Tamoxifen und Chinidin

[0145] Chinidin ist ein Arzneimittel, das häufig mit TdP in Verbindung gebracht wurde (Roden et al., Am. Heart J. 111: 1088–93 (1986)). Um die Hemmung von I_{Kr} durch Tamoxifen mit der durch Chinidin hervorgerufenen zu vergleichen, führten wir das Protokoll wie oben erörtert durch, unter Verwendung von entweder 10 $\mu\text{mol/L}$ Tamoxifen oder 10 $\mu\text{mol/L}$ Chinidin. Tamoxifen hemmte vollständig den I_{Kr} -Tail-Strom mit keiner beobachteten Erholung nach 5-minütigem Ausspülen, während dieselbe Konzentration an Chinidin (10 $\mu\text{mol/L}$) die I_{Kr} -Tail-Ströme nur teilweise hemmte, mit einer Erholung innerhalb von 3-minütigem Ausspülen. In anderen Versuchen wurde normalerweise die vollständige Erholung von I_{Kr} von der Chinidin-Hemmung nach ~5-minütigem Ausspülen beobachtet, während keine Erholung von Tamoxifen selbst nach 15-minütigem Ausspülen festgestellt werden konnte. **Fig. 5C** vergleicht die prozentuale Inhibierung von I_{Kr} durch Tamoxifen und Chinidin bei derselben Konzentration von 3.3 $\mu\text{mol/L}$. Diese Daten zeigen, dass bei dem geringsten Potential von -50 mV Tamoxifen eine merklich größere Inhibierung von I_{Kr} bewirkt als Chinidin ($84.8\% \pm 1.3\%$ im Vergleich zu $42.5\% \pm 9.1\%$, $p < 0.01$). Daher war Tamoxifen ein potenterer und länger-anhaltender Hemmer von I_{Kr} als Chinidin.

[0146] Einfluss von Tamoxifen auf APD und I_{Ca} . Wir untersuchten als Nächstes, ob Tamoxifen die Verlängerung der Aktionspotentialdauer (APD) verursacht. **Fig. 6** zeigt Aktionspotentiale, aufgezeichnet vor und nach 4-minütiger Exposition von 3.3 $\mu\text{mol/L}$ Tamoxifen. Obwohl Tamoxifen I_{Kr} bei dieser Konzentration bis ungefähr 84.8% inhibierte, wurde überraschenderweise keine merkliche Verlängerung der APD beobachtet. APD, gemessen bei 90% Repolarisation (APD_{90}) vor und nach ungefähr 4–5-minütiger Superfusion von Tamoxifen (3.3 $\mu\text{mol/L}$), war 341 ± 49 ms bzw. 332 ± 19 ms ($n=16$, $p > 0.05$). Da unter Kontrollbedingungen keine merkliche Verringerung der APD in den anfänglichen zehn Minuten nach Zellmembranbruch beobachtet wurde, war die Abwesenheit von APD-Verlängerung durch Tamoxifen nicht sekundär zu einem "Rückgang"-Phänomen.

[0147] Dieser unerwartete Einfluss auf die APD und vorherige Berichte von I_{Ca} -Hemmung durch Tamoxifen (Song et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 277: 1444–53 (1996)) veranlassten uns, den möglichen Einfluss von Tamoxifen auf den kardialen Einwärts- I_{Ca} zu untersuchen. Übereinstimmend mit früheren Studien von Song et al. (1996) in vaskulären Zellen aus glatten Muskeln, beobachteten wir ebenfalls einen potenten Einfluss von Tamoxifen in kardialen ventrikulären Myozyten von Kaninchen. Eine merkliche Inhibierung von I_{Ca} wurde bei Tamoxifen-Konzentrationen von größer 1 $\mu\text{mol/L}$ beobachtet, wobei eine beinahe vollständige Inhibition bei 10 $\mu\text{mol/L}$ beobachtet wurde (**Fig. 7**).

[0148] Da die Hemmung von I_{Ca} zu einer Verringerung der APD führen wird, könnte dieser Einfluss weitgehend den I_{Kr} -Hemmungseinfluss von Tamoxifen aufheben, was andernfalls zu einer Verlängerung der APD in einzelnen Kardiomyozyten von Kaninchen und zur Verlängerung des QT-Intervalls im ganzen Herzen führen würde. Der offensichtliche Widerspruch zwischen der Offensichtlichkeit in Kaninchen (z. B. kein Einfluss auf APD) und die Beobachtungen bei Menschen (z. B. QT-Verlängerung) könnte aus verschiedenen relativen Beiträgen von I_{Kr} oder I_{Ca} zu der APD und/oder verschiedenen relativen Wirksamkeiten von Tamoxifen bei der Hemmung von I_{Kr} gegen I_{Ca} in verschiedenen Spezies folgen. Der Nettoeinfluss von Tamoxifen, wie auch anderen Wirkstoffen, auf die APD in einer bestimmten Spezies würde daher sowohl von der relativen Mitwirkung des I_{Kr} gegen I_{Ca} auf die APD als auch der relativen Wirksamkeit von Tamoxifen bei der Hemmung von I_{Kr} gegen I_{Ca} abhängen.

[0149] Trotzdem ist die Haupteigenheit dieser Versuche (Beispiele 2 und 3), dass Tamoxifen wirksam die schnelle Komponente des verzögerten Gleichrichter-Stroms, I_{Kr} , in einer spannungs-, konzentrations- und zeitabhängigen Art und Weise hemmt. Kein merklicher Einfluss von Tamoxifen auf I_{K1} oder I_{to} wurde bei Konzentrationen bis zu 10 $\mu\text{mol/L}$ beobachtet (**Fig. 2**). Tamoxifen hemmt I_{Kr} mit einer Wirksamkeit sogar größer als Chinidin, ein Arzneimittel, für das gezeigt wurde, dass es I_{K} hemmt, und das mit einem hohen Auftreten von Arzneimittel induzierter TdP in Verbindung gebracht wird (Roden et al., (1986)). Dies ist unserem Wissen nach die erste Studie, die zeigt, dass Tamoxifen ein wirksamer und relativ selektiver Hemmer ist.

Beispiel 4

EKG Arrhythmie-Bewertung von Ibutilid

[0150] Hochpräzise und reproduzierbare Messungen des QT-Intervalls bei Menschen wurden entwickelt (Woosley et al., *Ant. J. Cardiol.* 72: 36B–43B (1993); Sale et al., *Clin. Pharmacol. Ther.* 56: 295–301 (1994)). EKG-Analyse ist ein Verfahren zur Bewertung von Arrhythmie, wie verlängerten QT-Intervallen. Ibutilid oder irgendein anderer zu untersuchender pharmazeutischer Wirkstoff kann durch Verwendung eines EKG bewertet werden. Es ist bevorzugt, das Arzneimittel (Ibutilid) intravenös zu verabreichen. Ibutilid bewirkt eine zuverlässige Verlängerung des QT-Intervalls und sein Einfluss baut sich schnell ab. Zwanzig männliche und zwanzig weibliche gesunde Freiwillige (Alter 21–40) erhielten eine einzelne, geringe Dosis von Ibutilid (0.003 mg/kg) und Reihen-EKGs wurden erhalten für Zeiträume vor der Ibutilidverabreichung (Zeit = 0) bis Zeit = 4 Stunden (z. B. 0.5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 240 und 360 Minuten nach Verabreichung). Alle EKGs waren zwölf Anhaltspunkte und wurden auf dem Datenträger und auf Papier bei einer Geschwindigkeit von 50 mm/sec aufgezeichnet, mit der Person in einer stationären, ruhenden, auf dem Rücken liegenden Position. Die EKGs wurden kodiert, zufällig angeordnet und blind gemessen unter Verwendung eines Computer-Operator-interaktiven Programms, unter Verwendung eines vorher in ((Woosley et al., (1993); Sale et al., (1994)) beschriebenen validierten Verfahrens. Frauen wurden während jeder Phase des Menstruationszyklus' (z. B. Menstruation, Ovulation und Lutealphase) untersucht, gesteuert durch die Zunahme des luteinisierten Hormons (LH) und bestätigt durch Estradion- und Progesteron-Plasma-Untersuchungen. Männer wurden nur einmal untersucht. Das Maximum und die durchschnittlichen QT-Veränderungen nach jeder Dosis von Ibutilid wurden mit der Basislinie verglichen.

[0151] Die Basislinien-QTc von Frauen während der Menstruation, Ovulation und Lutealphase waren ähnlich (410 ± 15 msec, 408 ± 15 msec bzw. 411 ± 12 msec), aber, wie erwartet, waren sie merklich länger als die Basislinien-QTc in Männern (397 ± 22 msec, $p < 0.01$) (Fig. 8). Um die QTc-Veränderungen über der Zeit, nach der Ibutilid-Infusion, besser analysieren zu können, verglichen wir den Bereich unter der Änderungskurve in QTc mit der Zeit über 60 Minuten nach der Infusion (Fig. 9); dies ist das Zeitintervall, in dem sowohl maximaler therapeutischer als auch toxischer Arzneimiteleinfluss erwarten werden. Die mittlere QTc-Veränderung über der Zeit war bei Männern merklich kleiner als bei Frauen ($p < 0.05$). Während der ersten Stunde hatten Frauen in der Lutealphase ihres Menstruationszyklus im Vergleich zu den anderen beiden Phasen die geringste QTc-Verlängerung sekundär zu Ibutilid (ANOVA $p < 0.05$) (Fig. 9).

[0152] Bei den Frauen waren die maximalen Veränderungen im QTc-Intervall nach der Ibutilid-Infusion in irgendeinem Zeit-Intervall während der Menstruation, Ovulation und Lutealphasen 63 ± 13 , 59 ± 17 bzw. 53 ± 14 msec ($p = \text{ns}$); und bei Männern waren es 54 ± 28 msec ($p = \text{ns}$). Wie man sieht, war der QTc-Verlängerungseinfluss von Ibutilid unverzüglich und war am Ende von zwei Stunden beinahe abgebaut. Die mittlere QTc-Verlängerung über der Zeit (AUC) nach Ibutilid war merklich niedriger für Frauen während der Lutealphase und für Männer verglichen mit Frauen während der anderen beiden Phasen des Menstruationszyklus' ($p < 0.05$).

Beispiel 5

Rolle des verzögerten Gleichrichter-Kalium-Stroms in spontan schlagenden Kardiomyozyten

[0153] Verzögerte Gleichrichter-Kaliumkanäle sind wichtige Komponenten der kardialen Repolarisation. Es gibt zwei hauptverzögerte Gleichrichter-Kalium-Ströme, I_{Kr} (schnelle Komponente) und I_{Ks} (langsame Komponente). Arzneimittel, die diese Ströme hemmen, insbesondere I_{Kr} , verlangsamen die kardiale Repolarisation und erhöhen das Risiko wirksame fatale kardiale Arrhythmie wie Torsades de Pointes zu entwickeln. Ferner wurden Mutationen in den Genen, die für verzögerte Gleichrichter-Kalium-Kanal-Proteine kodiert sind, mit dem long QT-Syndrom in Verbindung gebracht, eine Voraussetzung erkannt in Patienten mit hohem Risiko zur Entwicklung von Torsades de Pointes kardialer Arrhythmie und plötzlichem Tod. Während verschiedene spezifische Inhibitoren von I_{Kr} (d-Sotalol, Dofetilid, E-4031) seit mehreren Jahren zur Verfügung stehen, wurden Studien von endogenem I_{Ks} durch einen Mangel an pharmakologischen Hilfsmitteln zur selektiven Hemmung seiner Aktivität behindert. Kürzlich allerdings wurde von einer neuen Verbindung, Chromanol 293B, berichtet, die ein relativ selektiver Hemmer von I_{Ks} ist (Busch et al., *Pflug. Arch.* 432: 1094–6 (1996)). In dem vorliegenden Bericht haben wir diese Verbindung unter Verwendung von spontan schlagenden Kulturen von neonatalen Ratten-Kardiomyozyten getestet.

[0154] Zusätzlich zu den verschiedenen elektrophysiologischen Eigenschaften von I_{Kr} im Vergleich zu I_{Ks} , die

durch andere beschrieben wurden, können diese Ströme pharmakologisch unterschieden werden (Sanguinetti et al., J. Gen. Physiol. 96: 195–215 (1990)). Zum Beispiel wurde von E-4031 berichtet (Eisai Co., Ltd. Ibaraki, Japan), dass es bei Konzentrationen bis zu 5–10 mM I_{Kr} selektiv hemmt (Sanguinetti et al., (1990)), und Chromanol 293B (Hoechst Marion Roussel, Frankfurt, Deutschland) scheint bei Konzentrationen bis zu 10 bis 30 mM selektiv I_{Ks} zu hemmen (Busch et al., (1996)). Um zu bestimmen, ob die pharmakologische Hemmung von verzögerten Gleichrichter-Kalium-Strömen die spontane Schlagfrequenz von kultivierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten beeinflusst, wurde eine Dosis-Reaktionskurve für Chromanol 293B erstellt. Wie in [Fig. 1](#) gezeigt, verursachte Chromanol 293B eine Dosis-abhängige Verringerung der Schlagfrequenz, aber sogar bei der höchsten getesteten Arzneimittelkonzentration (100 mM) war die Verringerung der Schlagfrequenz nur ungefähr 50% zu der Kontrolle. In ventrikulären Myozyten von Meerschweinchen ist der IC_{50} -Wert für die 293B-Inhibierung von I_{Ks} ungefähr 2 mM, obwohl für die Erzielung der vollständigen Hemmung von I_{Ks} in diesen Zellen Konzentrationen bis zu 100 mM erforderlich waren (Busch et al., (1996)).

[0155] Wir beobachteten einen ähnlichen Typ von Dosis-Reaktion-Verhältnis bei der I_{Kr} -hemmenden Verbindung E-4031; allerdings wurden die interessantesten Ergebnisse beobachtet, wenn E-4031 und 293B zusammen zugegeben wurden (Bild B). Während hohe Konzentrationen (5–10 mM E-4031 und 50–100 mM 293B) von jedem Arzneimittel allein unzureichend für die vollständige Hemmung der Schlagaktivität waren (maximale Inhibierung = 50%), blockierte die Kombination dieser beiden Verbindungen alle Schlagaktivität völlig. Bemerkenswerterweise erlaubte die Behandlung mit dem β -adrenagenen Antagonist Isoproterenol (0.1–1 mM) die Rückgewinnung des größten Teils der Schlagaktivität (70 bis 80% des Kontrollwerts) trotz der kontinuierlichen Anwesenheit der I_{Kr} und I_{Ks} Inhibitoren.

[0156] Die einfachste Erklärung für diese Ergebnisse ist, dass es eine funktionelle Redundanz zwischen I_{Kr} und I_{Ks} geben kann und dass die vollständige Inhibierung eines der beiden Ströme allein eine gewisse Verlangsamung der Schlagfrequenz aufgrund des Verlustes der Repolarisierungsfähigkeit verursacht. Wenn allerdings I_{Kr} und I_{Ks} beide vollständig blockiert sind, können die Zellen nicht ausreichend repolarisieren, um die als Nächstes anstehende Repolarisierung zu ermöglichen, und demzufolge hören sie auf zu schlagen. Isoproterenol scheint in der Lage zu sein, diese Inhibierung weitgehend zu überwinden, wahrscheinlich durch seine bekannten stimulierenden Einflüsse auf die Kalziumkanäle (erhöhte Verfügbarkeit von I_{Ca} bei positiveren Spannungen) und vielleicht auch durch direkte Stimulation von I_{Ks} (Yazawa et al., J. Physiol. 421: 135–150 (1990); Pignier et al., Journal of Cardiovascular Pharmacology 31: 262–270 (1990) und Iijima et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 254: 142–146 (1990)).

Patentansprüche

1. Verfahren zum Feststellen, ob eine Person eine Neigung für QT-Intervallverlängerung aufweist, wenn sie mit einem oder mehreren pharmazeutischen Wirkstoffen behandelt wird, umfassend den Schritt des (A) Screenens einer biologischen Probe von der Person durch einen Nucleinsäure-Array, wobei der Nucleinsäure-Array Sonden für eine genetische Mutation oder für Polymorphismus in: (1) mindestens einem LQT-Gen und (2) mindestens einem Element, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus dem MDR-Gen und einem Cytochrom-P450-Gen, enthält.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei der Nucleinsäure-Array ein DNA-Array ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei der Nucleinsäure-Array ein Chip, ein Kügelchen oder eine Mikrokugel oder ein Mikrochip ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei das LQT-Gen ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus LQT1 (KCNQ1), LQT2 (HERG), LQT3 (SCN5A), LQT5 (KCNE1) und LQT6.

5. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei das Cytochrom-P450-Gen ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5 und CYP3A7.

6. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die Mutation oder der Polymorphismus ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus HERG (nt 1778, Punktmutation), KCNE1 (nt 226, Punktmutation), KCNQ1 (nt 217, Punktmutation), KCNQ1 (nt 284, Punktmutation), KCNQ1 (nt 475, Punktmutation), KCNQ1 (nt 521, Punktmutation), KCNQ1 (nt 629, Punktmutation), KCNQ1 (nt 655, Punktmutation), KCNQ1 (nt 659, Punktmutation), KCNQ1 (nt 737, Punktmutation), KCNQ1 (nt 746, Punktmutation), KCNQ1 (nt 1378, Punktmutation), KCNQ1 (nt 1244–1250, Deletion-Insertion) und SCN5A (nt 4513–4521, 9 bp Deletion).

7. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der pharmazeutische Wirkstoff ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Amiodaron, Amitriptylin, Amoxapin, Astemizol, Azelastin, Bepridil, Chlorpromazin, Cisaprid, Clarithromycin, Clemastin, Clomipramin, Desipramin, Diphenhydramin, Disopyramid, Doxepin, Erythromycin, Felbamat, Flecainid, Fluconazol, Fludrocortison, Fluoxetin, Fluphenazin, Fluvoxamin, Foscarnet, Fosphenytoin, Halofantrin, Haloperidol, Ibutilid, Imipramin, Indapamid, Ipecacuanha, Isradipin, Itraconazol, Ketoconazol, Levomethadyl, Maprotilin, Moexipril/HCTZ, Moricizin, Naratriptan, Nicardipin, Nortriptylin, Octreotid, Pentamidin, Perphenazin, Pimozid, Probuco, Procainamid, Prochlorperazin, Protriptylin, Quetiapin, Chinidin, Risperidon, Salmeterol, Sotalol, Sparfloxacin, Sumatriptan, Tamoxifen, Terfenadin, Thioridazin, Thiothixen, Tizanidin, Tocainid, Trifluoperazin, Trimethoprim-Sulfamethoxazol, Venlafaxin und Zolmitriptan.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

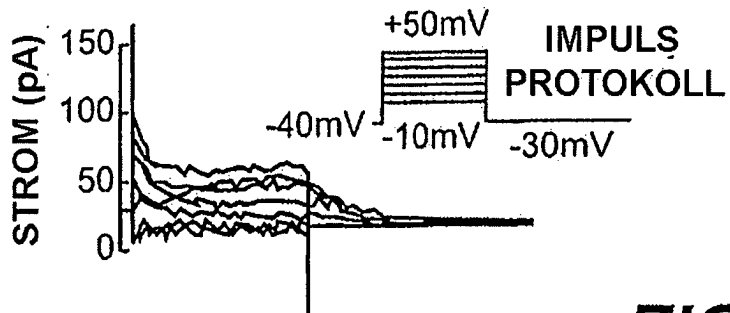


FIG. 1A

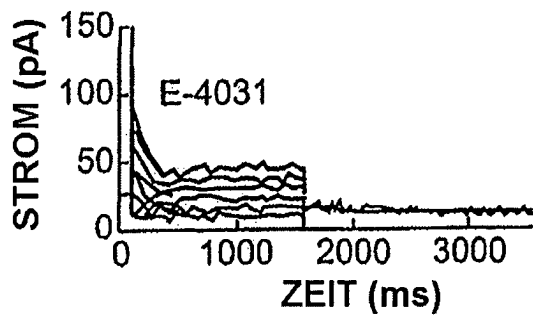


FIG. 1B

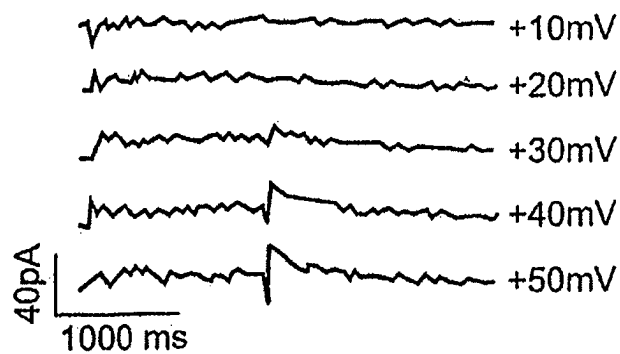


FIG. 1C

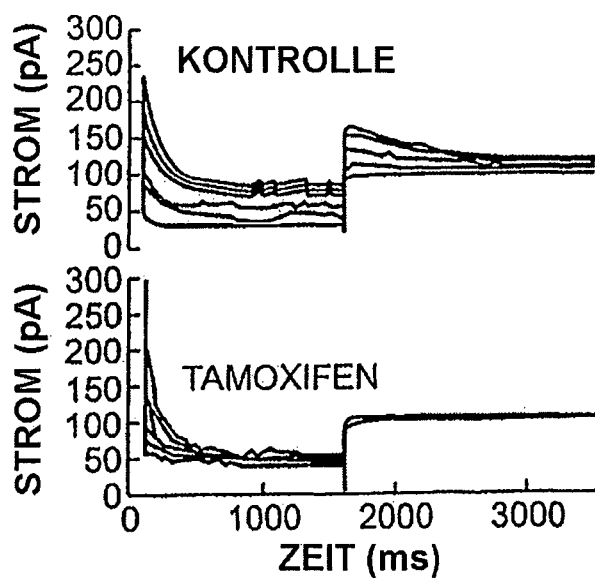
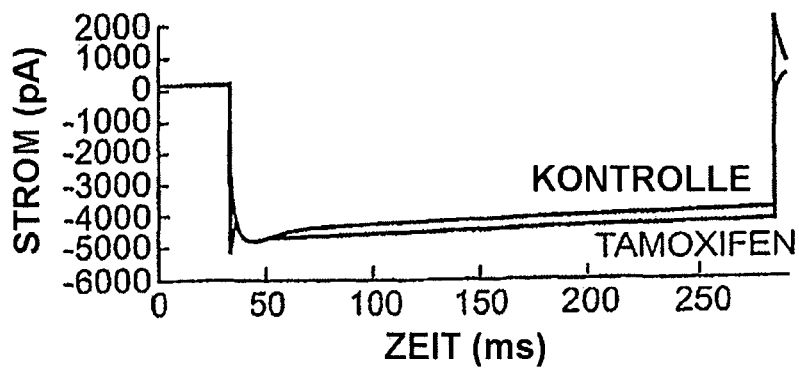
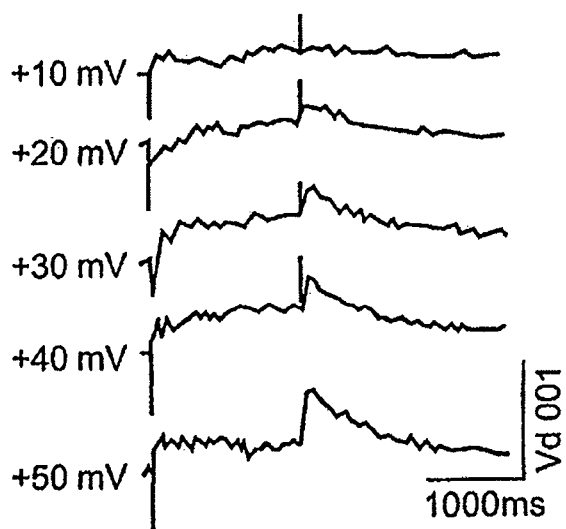


FIG. 2B



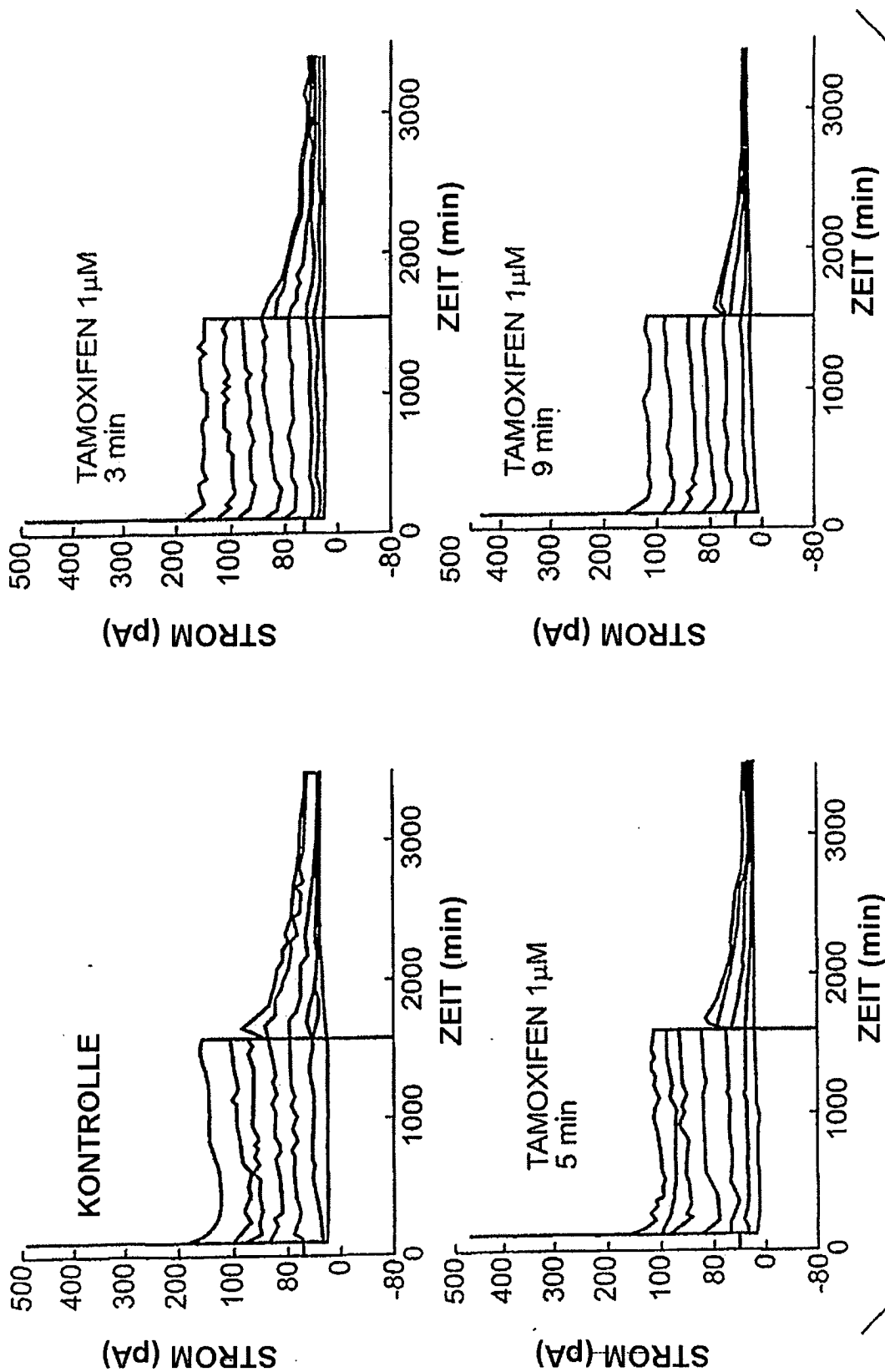


FIG. 3

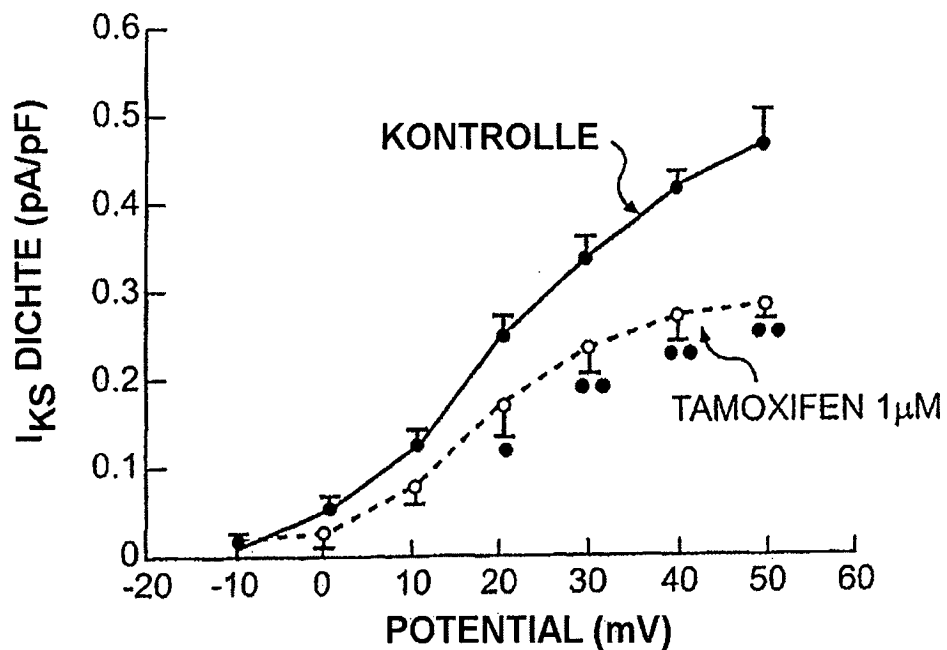


FIG. 4A

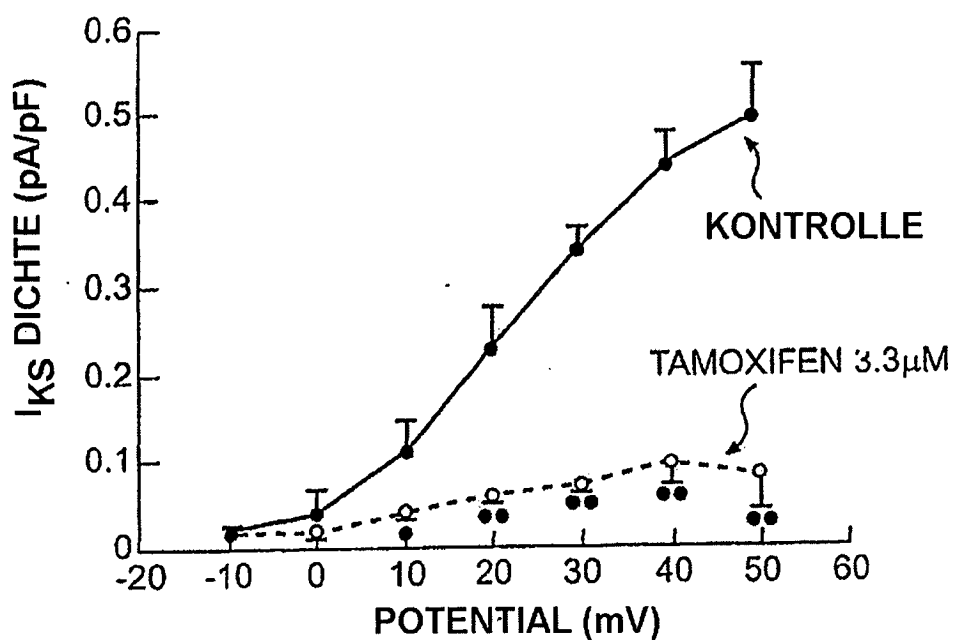


FIG. 4B

FIG. 5A

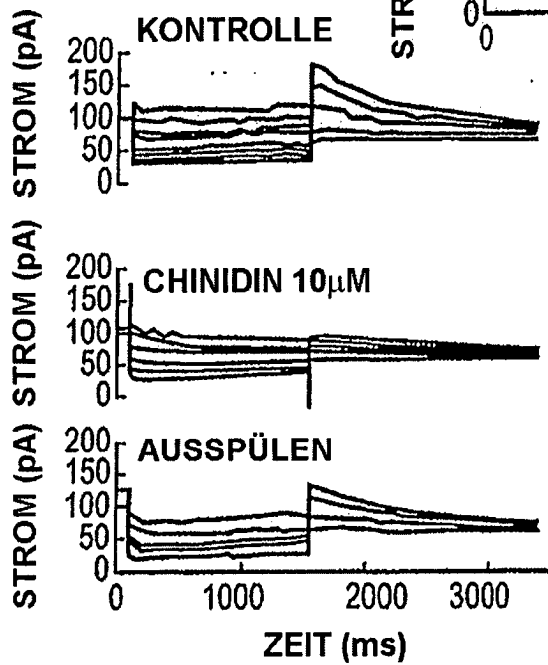
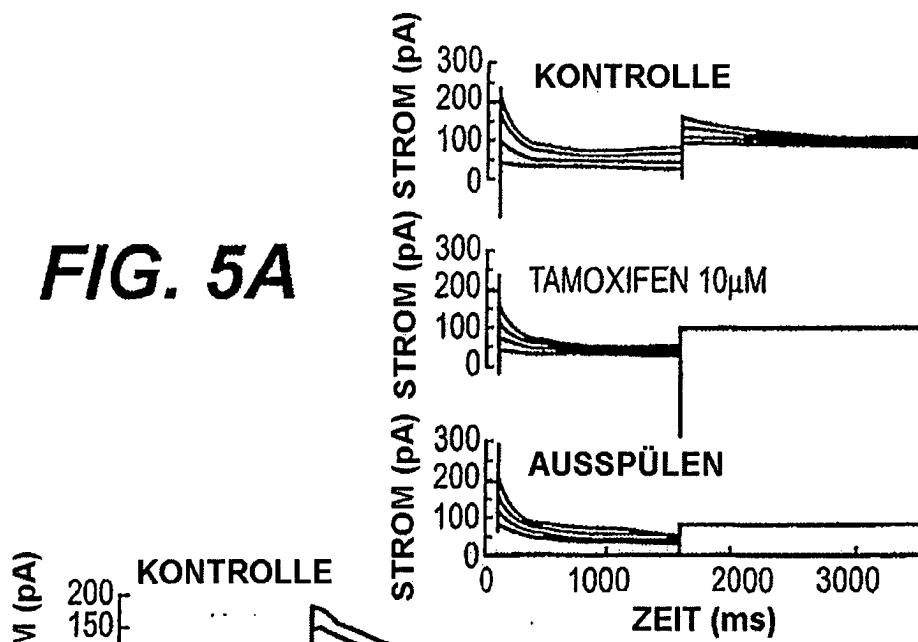


FIG. 5B

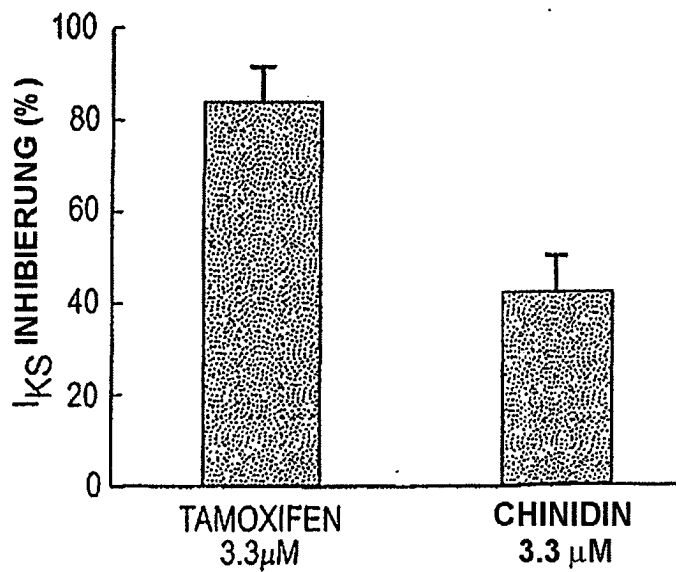


FIG. 5C

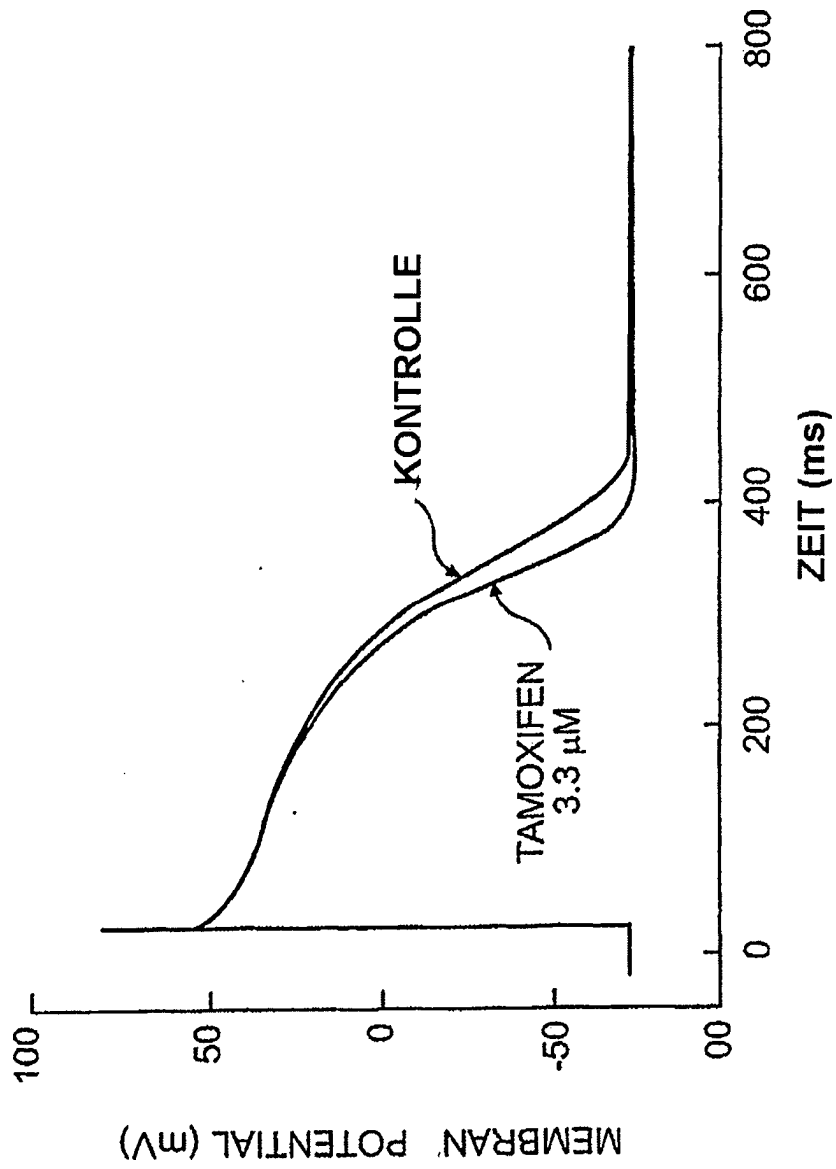


FIG. 6

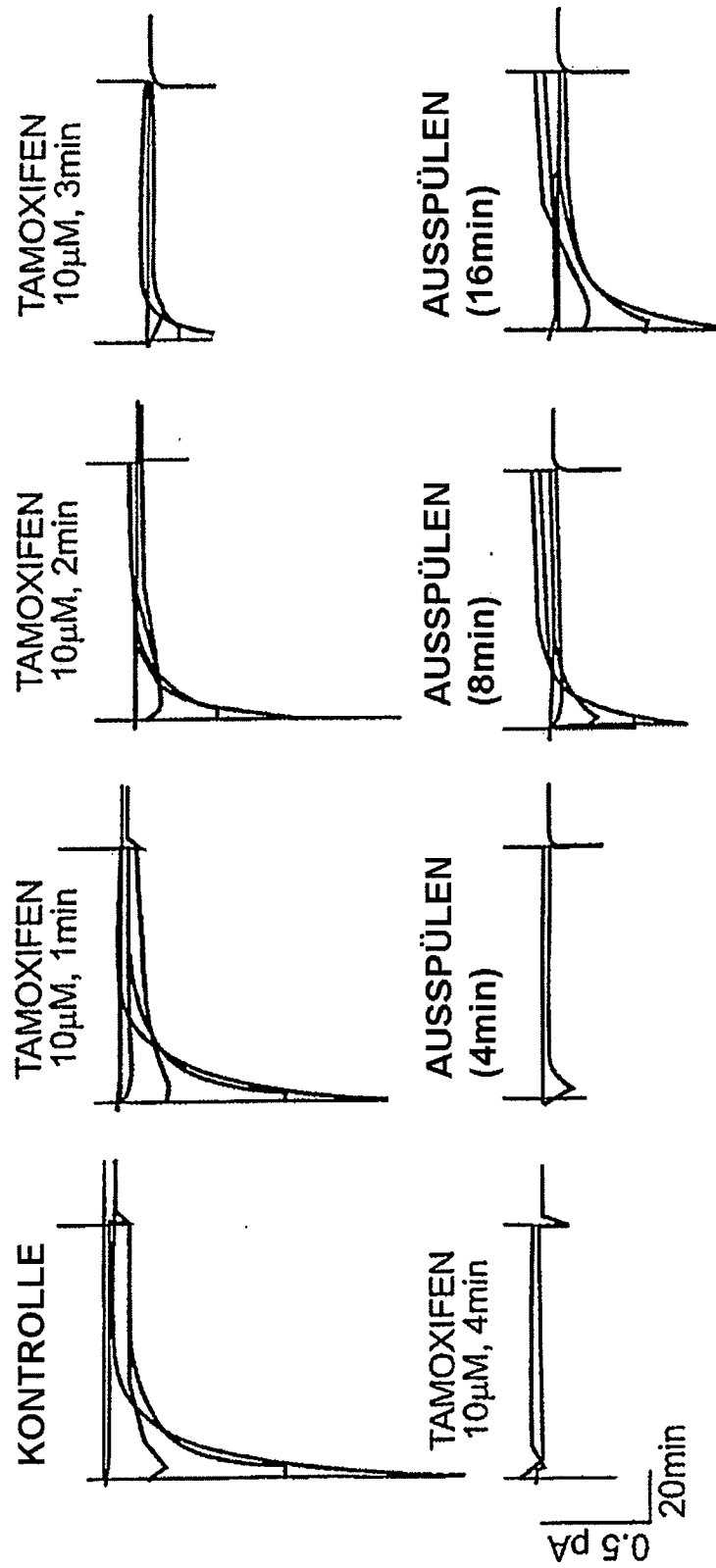


FIG. 7

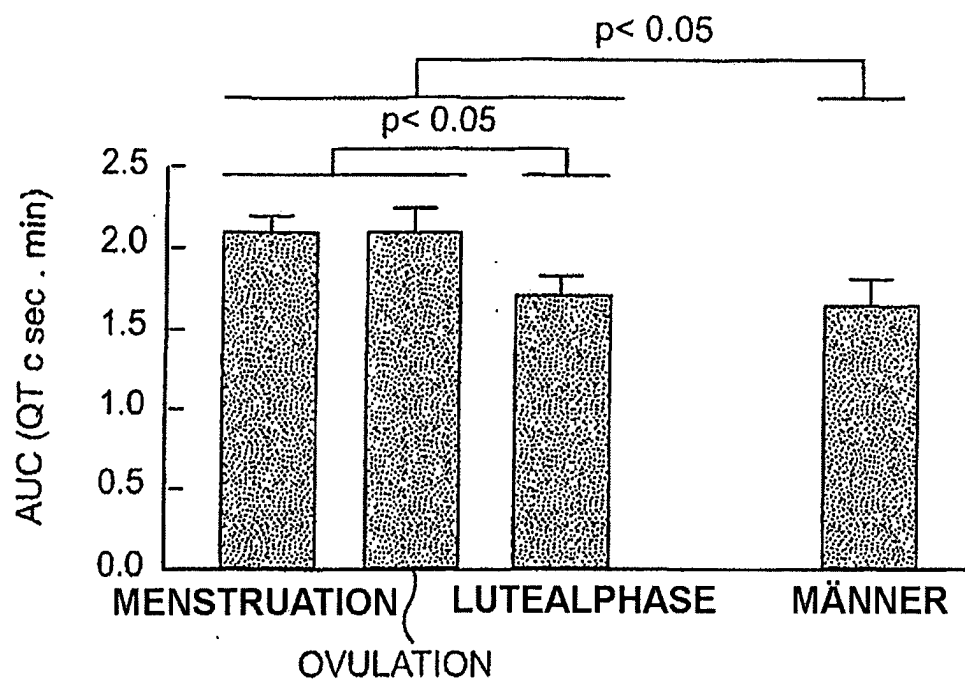


FIG. 8

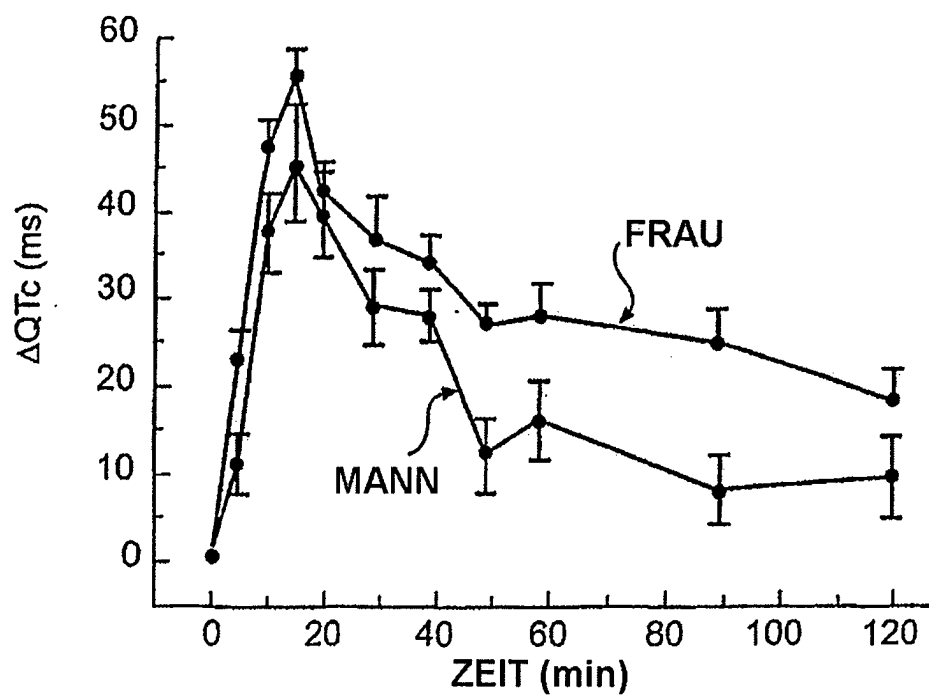


FIG. 9

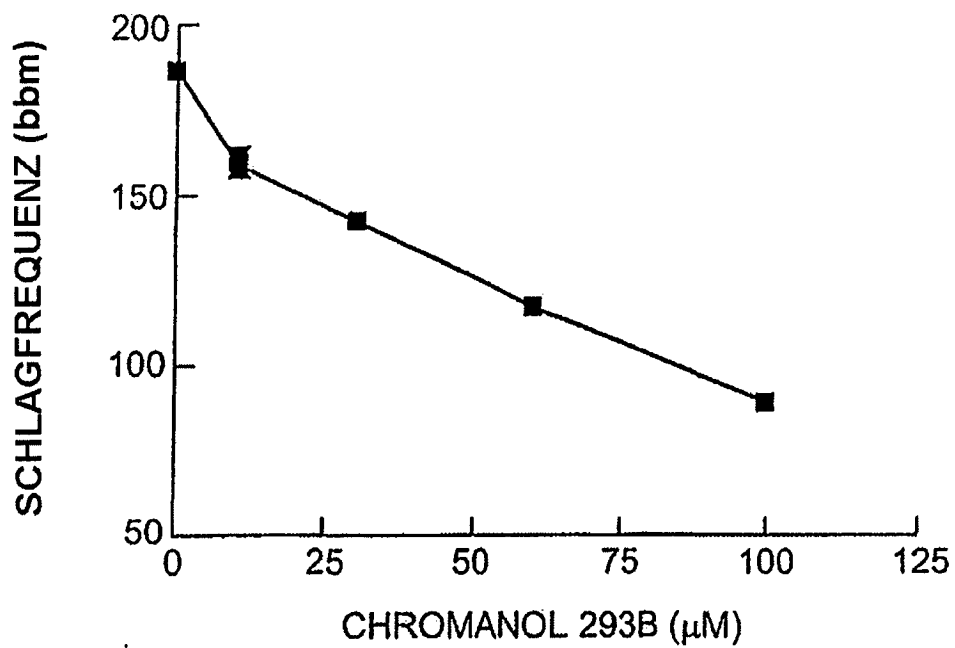


FIG. 10A

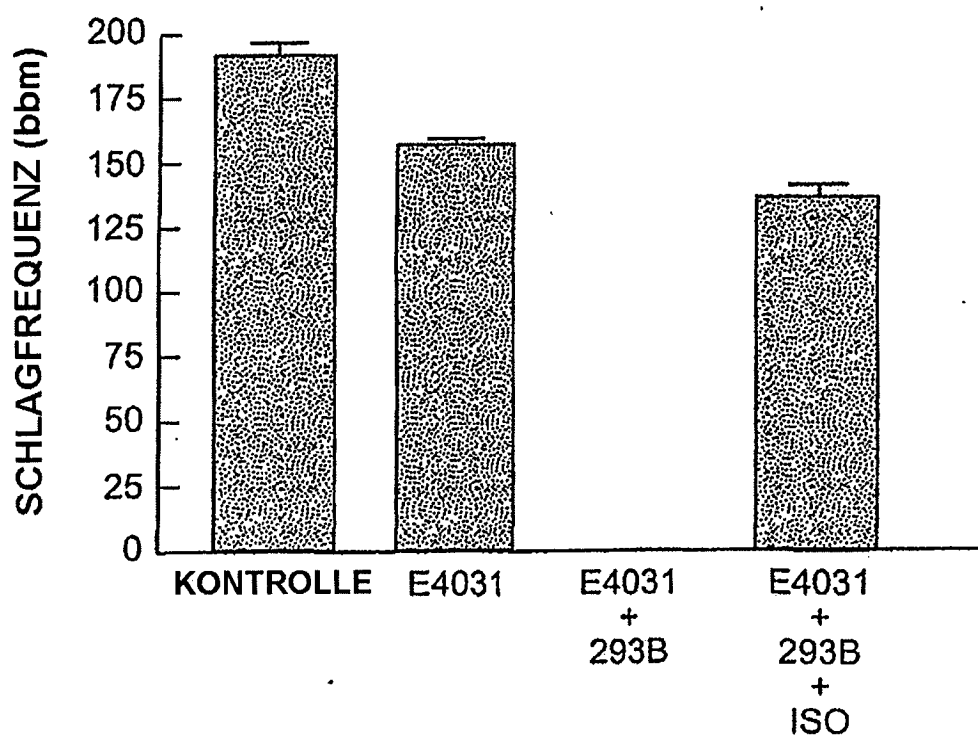


FIG. 10B