

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 471**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2003 E 10184644 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2336359**

54 Título: **1L1RL-1 como un marcador de enfermedades cardiovasculares**

30 Prioridad:

09.05.2002 US 379173 P

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

08.06.2016

73 Titular/es:

**THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.
(100.0%)
75 Francis Street
Boston, MA 02115, US**

72 Inventor/es:

LEE, RICHARD T.

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 573 471 T3

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

DESCRIPCIÓN

1L1RL-1 como un marcador de enfermedades cardiovasculares

5 La presente invención se refiere a procedimientos y a composiciones para el diagnóstico de afecciones cardiovasculares. Más específicamente, la invención se refiere a moléculas que pueden usarse para evaluar la probabilidad de que un sujeto se beneficiará del tratamiento de afecciones cardiovasculares, incluyendo infarto de miocardio e insuficiencia cardíaca.

Antecedentes de la invención

10 A pesar de los avances significativos en terapia, las enfermedades cardiovasculares siguen siendo la única causa más común de morbilidad y mortalidad en el mundo desarrollado. Por lo tanto, la prevención y terapia de afecciones cardiovasculares, tales como infarto de miocardio y accidentes cerebrovasculares, es un área de gran importancia sanitaria pública. Actualmente, se han descrito diversos factores de riesgo para futuros trastornos cardiovasculares y se usan ampliamente en el ámbito clínico para la detección de sujetos de alto riesgo. Dichos ensayos de exploración incluyen evaluaciones de los niveles de colesterol total y HDL. Sin embargo, aparentemente en sujetos con perfiles de riesgo de bajos a moderados, se produce una gran cantidad de trastornos cardiovasculares y la capacidad para 15 identificar a dichos pacientes es limitada. Además, cada vez más datos sugieren que los efectos beneficiosos de determinados tratamientos preventivos y terapéuticos para pacientes en riesgo de, o que se sabe que padecen, trastornos cardiovasculares, difieren en magnitud entre diferentes grupos de pacientes. Sin embargo, actualmente, no existen ensayos de diagnóstico que describan datos para determinar si puede esperarse que algunas terapias sean más o menos eficaces.

20 Resumen de la invención

La presente invención proporciona procedimientos para el diagnóstico de afecciones cardiovasculares. Se identificó un gen regulado positivamente en células cardíacas cuando las células se sometían a deformación inducida mecánicamente.

25 Esta molécula de ácido nucleico es receptora de interleucina 1 de tipo I (IL1RL-1, también conocido como T1/ST2, ST2 y Fit-1, SEC ID Nos: 1 y 2 para la forma soluble y SEC ID Nos: 3 y 4 para la forma de membrana). En lo sucesivo, en este documento, los términos IL1RL-1, T1/ST2, ST2 y Fit-1, se usarán indistintamente a lo largo de la memoria descriptiva.

De acuerdo con la invención, se proporciona un procedimiento *in vitro* para evaluar la probabilidad de que un sujeto se beneficiará del tratamiento con un agente para reducir el riesgo de una afección cardiovascular.

30 En un primer aspecto, la invención proporciona un método *in vitro* para evaluar la probabilidad de que un sujeto se beneficiará del tratamiento con un agente seleccionado del grupo que consiste en un agente antiinflamatorio, un agente antitrombótico, un agente antiplaquetas, un agente fibrinolítico, un agente hipolipemiante, un inhibidor directo de la trombina, un inhibidor del receptor de glicoproteína IIb/IIIa, un anticuerpo de molécula de adhesión anti-celular monoclonal o policlonal que inhibe la capacidad de los leucocitos para unir a las moléculas de adhesión celular, un 35 bloqueador de los canales de calcio, un bloqueador del receptor beta-adrenérgico, un inhibidor de la ciclooxigenasa-2 y un inhibidor del sistema de angiotensina. El procedimiento comprende:

la obtención de un primer nivel de proteína IL1RL-1 soluble en una muestra de un sujeto;

40 la comparación del nivel de la proteína IL1RL-1 soluble a un valor predeterminado específico para el diagnóstico de una afección cardiovascular seleccionada del infarto de miocardio e insuficiencia cardíaca, en donde el valor predeterminado es un solo valor de límite, y en donde un nivel de la proteína IL1RL-1 soluble igual o por encima del valor de límite predeterminado es indicativo de si el sujeto se beneficiará del tratamiento con dicho agente.

Las características y realizaciones preferidas de la invención se describen en las reivindicaciones dependientes adjuntas (reivindicaciones 2-7).

45 En ciertas realizaciones, el valor predeterminado específico para el diagnóstico de una afección cardiovascular es una pluralidad de intervalos de nivel marcador predeterminada y dicha etapa de comparación comprende determinar en cuál de dichos intervalos de nivel del marcador predeterminado, se incluye el nivel de dichos sujetos. La afección cardiovascular se selecciona entre el infarto de miocardio e insuficiencia cardíaca.

Estos y otros objetos de la invención se describirán con más detalle junto con la descripción detallada de la invención.

Breve descripción de las secuencias

La SEC ID N°: 1 es la secuencia de nucleótidos del ADNc de IL1RL1 humana (soluble).

La SEC ID N°: 2 es la secuencia de aminoácidos supuesta del producto de traducción del ADNc de la IL1RL1 humano (soluble) (SEC ID N°: 1).

5 La SEC ID N°: 3 es la secuencia de nucleótidos del ADNc de IL1RL1 humano (membrana).

La SEC ID N°: 4 es la secuencia de aminoácidos supuesta del producto de traducción de la IL1RL1 humano (membrana) (SEC ID N°: 3).

La SEC ID N°: 5 es la secuencia de nucleótidos del ADNc de Fit-1S de rata.

10 La SEC ID N°: 6 es la secuencia de aminoácidos supuesta del producto de traducción de ADNc de Fit-1S de rata (SEC ID N°: 5).

La SEC ID N°: 7 es la secuencia de nucleótidos del ADNc de Fit-1M de rata.

La SEC ID N°: 8 es la secuencia de aminoácidos supuesta del producto de traducción de ADNc de Fit-1M de rata (SEC ID N°: 7).

Breve descripción de los dibujos

15 La Figura 1 representa mediante una transferencia Northern, los efectos de una tensión mecánica cíclica al 8% sobre la expresión de Fit-1 en miocitos cardiacos cultivados a lo largo del tiempo.

La figura 2 representa mediante una transferencia Northern, los efectos de una tensión mecánica cíclica al 8%, el bloqueo del receptor de la angiotensina, angiotensina II, IL-1b, y éster de forbol, sobre la expresión de IL1RL-1 en miocitos cardiacos cultivados a lo largo del tiempo.

20 La Figura 3 representa mediante una transferencia Northern, los efectos de una tensión mecánica cíclica al 8%, peróxido de hidrógeno, y TIRON, sobre la expresión de IL1RL-1 en miocitos cardiacos cultivados a lo largo del tiempo.

La Figura 4 representa mediante una transferencia Northern, los efectos de actinomicina D y ciclohexamida sobre la inducción de la expresión de IL1RL-1 durante una tensión mecánica cíclica al 8% en miocitos cardiacos durante el transcurso de tiempo.

25 La Figura 5 representa mediante una transferencia Northern, los efectos de una tensión mecánica cíclica al 8% sola y en combinación con IL-1b, y éster de forbol en ausencia de tensión, sobre la expresión de IL1RL-1 en miocitos cardiacos cultivados a lo largo del tiempo.

La Figura 6 representa una transferencia Northern de los efectos de una tensión mecánica cíclica al 8% en la expresión de ATPasa vacuolar en miocitos cardiacos cultivados a lo largo del tiempo.

30 La Figura 7 representa un kit que incorpora las características de la presente invención.

La Figura 8 representa evolución precoz (a la izquierda) y tardía (a la derecha) de la inducción del ARNm de T2/ST2 mediante tensión mecánica en los miocitos cardiacos. La inducción máxima se produce a las 3 horas, se mantiene durante 9 horas y declina por 15 horas. En los paneles superiores, ARN de T1/ST2; paneles inferiores, bromuro de etidio. Sin ten, sin tensión.

35 La Figura 9 representa la inducción de ARNm de T1/ST2 por tensión mecánica (8%), interleucina-1 (10 ng/mL) y éster de forbol (PMA, 200 nM) en 1 y 3 horas. PMA>tensión>IL-1. Panel superior, ARNm de T1/ST2, panel inferior, bromuro de etidio.

40 La Figura 10 muestra que T1/ST2 puede ser un gen inducido por la activación de NF-κB durante la señalización del receptor IL-1/IL en miocitos cardiacos. ARNm de T1/ST2 inducido por tensión y por IL-1 en la presencia de la infección con adenovirus de control (izquierda). Con la infección de adenovirus IκB (derecha), que disminuye la actividad de unión a ADN con NF-κB, se bloqueó la inducción de T1/ST2 por IL-1. La inducción de tensión de T1/ST2 fue bloqueada parcialmente por infección por adenovirus IκB sugiriendo otra vía para inducción de T1/ST2 por tensión. Panel superior, ARNm de T1/ST2; panel inferior, bromuro de etidio.

La figura 11 muestra, la expresión de la proteína T1/ST2 después de infarto de miocardio en ratones mediante inmunohistoquímica en el día 1, pero no 3 días después del infarto. Aumento de 40X.

La Figura 12 muestra de forma gráfica, los niveles de proteína ST2 en la circulación sistémica de pacientes humanos después de infarto de miocardio; a. proteína ST2 se incrementó significativamente en el día 1 después de infarto de miocardio en comparación con el día 14 y el día 90; b. Análisis de regresión lineal que demuestra una relación positiva significativa ($p < 0.001$) entre la proteína ST₂ circulante y creatina quinasa 1 después de infarto de miocardio. $\text{Log ST}_2 = 0.454(\text{log CK}) - 1.07$; c. Análisis por cuartiles de los niveles de proteína ST2 circulantes el día 1 después de infarto de miocardio y fracción de eyección. La fracción de eyección baja se asocia con niveles elevados de proteína ST2.

La figura 13 muestra que niveles basales de ST2 elevados eran indicadores de una mayor mortalidad a través de los 30 días de seguimiento (rango logarítmico, $p = 0.0009$).

Descripción detallada de la invención

La invención implica el descubrimiento de un número de genes regulados positivamente en las células cardiacas cuando las células se someten a una deformación por tensión inducida mecánicamente.

"Regulación positiva", como se usa en este documento, se refiere a aumento de la expresión de un gen y/o de su polipéptido codificado. El "aumento de expresión" se refiere a aumentar (esto es, a un grado detectable) de replicación, transcripción y/o traducción de cualquiera de los ácidos nucleicos revelados (IL1RL-1, SEC ID Nos.: 1, 3), ya que la regulación positiva de cualquiera de estos procesos da como resultado un aumento de la concentración/cantidad del polipéptido codificado por el gen (ácido nucleico). Por el contrario, "regulación negativa" o "disminución de la expresión" como se usa en este documento, se refiere a la disminución de expresión de un gen y/o su polipéptido codificado. La regulación positiva o regulación negativa de la expresión génica se puede determinar directamente mediante la detección de un aumento o disminución, respectivamente, en el nivel de ARNm para el gen, o el nivel de expresión de la proteína del polipéptido codificado por el gen, utilizando cualquier medio apropiado conocido en la materia, tales como hibridación de ácidos nucleicos o procedimientos de detección de anticuerpos, respectivamente y comparando con controles. Alleyne et al., 2001, Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 90. Pg. 97-105 revela un método para evaluar si un sujeto que sufre de infarto de miocardio se beneficiará de un tratamiento basado en la evaluación de los niveles de citocromo-C en una muestra.

Una "célula cardíaca", como se usa en este documento, se refiere a un cardiomiocito.

Una "molécula", como se usa en este documento, abarca tanto "ácidos nucleicos" como "polipéptidos".

"Expresión", como se usa en este documento, se refiere a la expresión del ácido nucleico y/o polipéptido.

Como se usa en este documento, un "sujeto" es un mamífero o un mamífero no humano. En todas las realizaciones se prefieren ácidos nucleicos, polipéptidos, y sujetos humanos. Se cree que los resultados obtenidos utilizando las moléculas de humanos y de rata descritos en el presente son predictivos de los resultados que se pueden obtener usando otras secuencias homólogas.

En general, homólogos y alelos compartirán por lo general al menos una identidad de nucleótidos del 80% y/o al menos una identidad de aminoácidos del 85% con respecto a las secuencias humanas caracterizadas de la invención. En otros casos, homólogos y alelos compartirán por lo general al menos una identidad del 90%, 95% o incluso 99% de nucleótidos y/o al menos una identidad del 95%, 98% o incluso 99% de aminoácidos con respecto a las secuencias humanas caracterizadas, respectivamente. La homología puede calcularse usando diversas herramientas informáticas disponibles al público, desarrolladas por NCBI (Bethesda, Maryland). Las herramientas de ejemplo incluyen el algoritmo heurístico de Altschul SF, y col., (J Mol Biol, 1990, 215: 403-410), conocido también como BLAST. Pueden obtenerse alineamientos por parejas y ClustalW (ajuste de matriz BLOSUM30) así como análisis hidropáticos Kyte-Doolittle usando herramientas públicas (EMBL, Heidelberg, Alemania) y comerciales (por ejemplo, el programa informático de análisis de secuencias MacVector de Oxford Molecular Group/Genetics Computer Group, Madison, WI, Accelrys, Inc., San Diego, CA). La invención también abarca complementos de Watson-Crick de los ácidos nucleicos anteriores.

En la selección de genes relacionados, tales como homólogos y alelos de las secuencias descritas en cualquier parte en este documento, puede realizarse una transferencia de Southern usando condiciones rigurosas, junto con una sonda. La expresión "condiciones rigurosas", como se usa en este documento, se refiere a parámetros con los que la técnica está familiarizada. Con ácidos nucleicos, se dice que las condiciones de hibridación son rigurosas por lo general en condiciones de baja fuerza iónica y con una temperatura exactamente por debajo de la temperatura de fusión (T_f) del complejo híbrido de ADN (por lo general, aproximadamente 3 °C por debajo de la T_f del híbrido). Una mayor rigurosidad constituye una correlación más específica entre la secuencia de la sonda y la diana. Las condiciones rigurosas usadas en la hibridación de ácidos nucleicos se conocen bien en la materia y pueden encontrarse en las referencias que

recopilan dichos procedimientos, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, o Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Un ejemplo de "condiciones muy rigurosas" es la hibridación a 65 °C en 6 x SSC. Otro ejemplo de condiciones muy rigurosas es la hibridación a 65 °C en solución reguladora de hibridación que consiste en 3.5 x SSC, Ficoll al 0.02%, polivinilpirrolidona al 0.02%, Albúmina de Suero Bovino al 0.02%, NaH₂PO₄ 2.5 mM [pH7], SDS al 0.5%, EDTA 2 mM. (SSC es cloruro de sodio 0.015 M/citrato de sodio 0.15 M, pH 7; SDS es dodecil sulfato de sodio; y EDTA es ácido etilendiaminotetraacético). Después de la hibridación, la membrana sobre la cual se transfiere el ADN, se lava 2 x SSC a temperatura ambiente y después 0.1 x SSC / 0,1 x SDS a temperaturas de hasta 68 °C. En un ejemplo adicional, una alternativa al uso de una solución de hibridación acuosa es el uso de una solución de hibridación con formamida. Por lo tanto, pueden conseguirse condiciones de hibridación rigurosas usando, por ejemplo, una solución de formamida al 50% y a 42 °C. Existen otras condiciones, reactivos, etc., que se pueden utilizar, y daría lugar a un grado similar de rigurosidad. El experto en el arte estará familiarizado con dichas condiciones, y por lo tanto no se proporcionan en este documento. Sin embargo, se entenderá, que el experto en el arte podrá manejar las condiciones para permitir identificar claramente homólogos y alelos de ácidos nucleicos de IL1RL-1. El experto en el arte también está familiarizado con la metodología para la selección de células y bibliotecas para la expresión de dichas moléculas que luego se aíslan de forma rutinaria, seguido de aislamiento de la molécula de ácido nucleico pertinente y secuenciación.

A partir de los conocimientos del presente documento de clones de ADNc de rata y de seres humanos de longitud completa, pueden aislarse otras secuencias de mamíferos (ratón, bovinos, etc) tales como los ADNc correspondientes a los ácidos nucleicos de rata y de ser humano relacionados, a partir de genotecas de ADNc usando técnicas de hibridación de colonias convencionales o pueden identificarse usando una búsqueda de homología, por ejemplo, en GenBank usando cualquiera de los algoritmos descritos en cualquier parte del presente documento o conocidos en la materia. Por ejemplo, con las secuencias con los números iniciales GenBank Y07519.1 y D13695.1 para los homólogos IL1RL-1 de ratón, pueden usarse indistintamente con las secuencias de rata homólogas.

Como se usa en el presente documento, con respecto a los ácidos nucleicos, la expresión "aislado" significa: (i) amplificado *in vitro*, por ejemplo, por reacción en cadena de la polimerasa (PCR); (ii) producido de manera recombinante por clonación; (iii) purificado, como por escisión y separación en gel; o (iv) sintetizado, por ejemplo, por síntesis química. Un ácido nucleico aislado es uno que se maneja fácilmente por técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la materia. Por lo tanto, se considera aislada, una secuencia de nucleótidos contenida en un vector en el que se conocen los sitios de restricción 5' y 3' o para los que se han desvelado las secuencias cebadoras de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) pero no lo es una secuencia de ácidos nucleicos existente en su estado natural en su huésped natural. Un ácido nucleico aislado puede purificarse sustancialmente, pero no necesariamente. Por ejemplo, un ácido nucleico que está aislado dentro de un vector de expresión o de clonación no es puro ya puede comprender solamente un pequeño porcentaje del material en la célula en la cual reside. Sin embargo, como se usa el término en el presente documento, dicho ácido nucleico está aislado porque, mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos habituales en el arte, se maneja fácilmente.

La expresión de cualquiera de los ácidos nucleicos de IL1RL-1 anteriores, incluyendo fragmentos únicos de los anteriores, puede determinarse usando diferentes metodologías. Un "fragmento único", como se usa en el presente documento, con respecto a un ácido nucleico, es uno que es una "firma" para el ácido nucleico más largo. Por ejemplo, el fragmento único es suficientemente largo como para garantizar que su secuencia exacta no se encuentre en moléculas dentro del genoma humano fuera de la secuencia para cada ácido nucleico definido anteriormente. Los expertos habituales en el arte pueden aplicar no más que los procedimientos rutinarios para determinar si un fragmento es único dentro del genoma humano. Sin embargo, los fragmentos únicos, excluyen fragmentos completamente compuestos por secuencias de nucleótidos previamente publicadas como de la fecha de presentación de esta solicitud.

Para identificar dichos ácidos nucleicos, pueden usarse fragmentos únicos como sondas en ensayos de transferencia Southern y Northern o pueden usarse en ensayos de amplificación tales como los que emplean PCR. Como saben los expertos en el arte, para determinados usos, tales como transferencia Southern y Northern, se prefieren sondas grandes tales como de 200, 250, 300 o más nucleótidos mientras que se preferirán fragmentos más pequeños para otros usos tales como PCR. También pueden usarse fragmentos únicos para producir proteínas de fusión para la generación de anticuerpos o para la determinación de la unión de los fragmentos polipeptídicos o para la generación de componentes de inmunoensayo. Del mismo modo, los fragmentos únicos pueden emplearse para producir fragmentos no fusionados, por ejemplo, de los polipéptidos de IL1RL-1, útiles, por ejemplo, en la preparación de anticuerpos, inmunoensayos o aplicaciones terapéuticas. Adicionalmente, los fragmentos únicos pueden usarse como moléculas antisentido para inhibir, respectivamente, la expresión de los ácidos nucleicos y polipéptidos anteriores.

Como reconocerán los expertos en el arte, el tamaño del fragmento único dependerá de su conservación en el código genético. Por lo tanto, algunas regiones de las SEC ID Nos: 1 y 3 y complementos necesitarán segmentos más largos para ser únicos mientras que otros necesitarán solamente segmentos cortos, por lo general entre 12 y 32 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 y 32 bases) o más,

hasta la longitud completa de cada una de las secuencias reveladas. Como se ha mencionado anteriormente, la presente divulgación pretende abarcar cada uno y todos los fragmentos de cada secuencia, comenzando desde el primer nucleótido, el segundo nucleótido y así sucesivamente, hasta 8 nucleótidos cortos del final y acabar en cualquier lado a partir del nucleótido número 8, 9, 10 y así sucesivamente para cada secuencia, hasta el nucleótido más alejado (siempre que la secuencia sea única como se ha descrito anteriormente). Por ejemplo, será único, prácticamente cualquier segmento de la región de la SEC ID N°: 1 que comience en el nucleótido 1 y que acabe en el nucleótido 1357 o de la SEC ID N°: 3 que comience en el nucleótido 1 y acabe en el nucleótido 2058, o sus complementos, es decir 20 o más nucleótidos de longitud. Los expertos en el arte conocerán bien procedimientos para seleccionar dichas secuencias, por lo general en base a la capacidad del fragmento único para distinguir selectivamente la secuencia de interés de otras secuencias en el genoma humano del fragmento con las de las bases de datos conocidas por lo general es todo lo que se necesita, aunque puede realizarse hibridación confirmativa *in vitro* y análisis de secuenciación.

Se revelan vectores de expresión que codifican proteínas codificadas por los ácidos nucleicos correspondientes a las SEC ID Nos: 1 y/o 3, fragmentos y variantes de los mismos y células hospedadoras que contienen estos vectores de expresión. Prácticamente cualquier célula, procariota o eucariota, que pueda transformarse con ADN o ARN heterólogo y que pueda cultivarse o mantenerse en cultivo, puede usarse. Los ejemplos incluyen células bacterianas tales como *Escherichia coli* y células de mamíferos tales como de ratón, hámster, cerdo, cabra, primate, etc. Estas pueden ser de una amplia diversidad de tipos de tejidos incluyendo mastocitos, fibroblastos, oocitos y linfocitos y pueden ser células primarias o líneas celulares. Los ejemplos específicos incluyen células CHO y células COS. En lugar de células, también pueden usarse sistemas de transcripción acelulares.

Como se usa en el presente documento, un "vector" puede ser cualquiera de una serie de ácidos nucleicos en los que puede insertarse una secuencia deseada por restricción y ligamiento, para el transporte entre diferentes entornos genéticos o para la expresión en una célula huésped. Los vectores por lo general están compuestos de ADN, aunque también se encuentran disponibles vectores de ARN. Los vectores incluyen, pero sin limitación, genomas de plásmidos, fagémidos y virales. Un vector de clonación es uno que es capaz de replicarse en una célula huésped, y que además se caracteriza por uno o más sitios de restricción endonucleasa en los cuales puede cortarse el vector de una manera determinada y en los cuales puede ligarse una secuencia de ADN deseada de manera que el nuevo vector recombinante conserve su capacidad para replicarse en la célula huésped. En el caso de plásmidos, la replicación de la secuencia deseada puede producirse muchas veces a medida que el plásmido aumenta en número de copias dentro de la bacteria huésped o exactamente una sola vez por huésped antes de que el huésped se reproduzca por mitosis. En el caso de fagos, la reproducción puede producirse de manera activa durante una fase lítica o de manera pasiva durante una fase lisogénica. Un vector de expresión es uno en el que puede insertarse una secuencia de ADN deseada por restricción y ligamiento de manera que se une operativamente a secuencias reguladoras y que puede expresarse como un transcrito de ARN. Los vectores también pueden contener una o más secuencias marcadoras apropiadas para su uso en la identificación de células que se han transformado o transfectado, o ninguna de las dos cosas, con el vector. Los marcadores incluyen, por ejemplo, genes que codifican proteínas que aumentan o disminuyen la resistencia o sensibilidad frente a antibióticos u otros compuestos, genes que codifican enzimas cuyas actividades son detectables mediante ensayos convencionales conocidos en la materia (por ejemplo, β -galactosidasa o fosfatasa alcalina), y genes que afectan visiblemente al fenotipo de las células, huéspedes, colonias o placas, transformadas o transfectadas, (por ejemplo proteína verde fluorescente). Los vectores preferidos son los capaces de replicación y expresión autónoma de los productos génicos estructurales presentes en los segmentos de ADN a los cuales se unen operativamente.

Como se usa en el presente documento, se dice que una secuencia codificante y secuencias reguladoras están "unidas operativamente" cuando están unidas covalentemente de tal manera que colocan la expresión o transcripción de la secuencia codificante bajo la influencia o control de las secuencias reguladoras. Si se desea que las secuencias codificantes se traduzcan en una proteína funcional, se dice que dos secuencias de ADN están unidas operativamente si la inducción de un promotor en las secuencias reguladoras 5' da como resultado la transcripción de la secuencia codificante y si la naturaleza de la unión entre las dos secuencias de ADN no (1) da como resultado la introducción de una mutación de cambio de fase, (2) interfiere con la capacidad de la región promotora para dirigir la transcripción de las secuencias codificantes o (3) interfiere con la capacidad del transcrito de ARN correspondiente para traducirse en una proteína. Por lo tanto, una región promotora se uniría operativamente a una secuencia codificante si la región promotora fuera capaz de efectuar la transcripción de esta secuencia de ADN de manera que el transcrito resultante pudiera traducirse en la proteína o en el polipéptido deseado.

La naturaleza exacta de las secuencias reguladoras necesarias para la expresión génica puede variar entre especies o tipos de células, pero en general incluirán, si fuera necesario, secuencias 5' no transcritas y 5' no traducidas, implicadas con el inicio de la transcripción y traducción respectivamente, tales como la caja TATA, la secuencia de terminación, la secuencia CAAT y similares. Dichas secuencias reguladoras 5' no transcritas incluirán frecuentemente una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control transcripcional del gen unido operativamente. Las secuencias reguladoras también pueden incluir secuencias potenciadoras o secuencias activadoras cadena arriba, según se desee. Los vectores pueden incluir opcionalmente secuencias líder o de señal 5'. La elección y el diseño de un vector apropiado se encuentran dentro de la habilidad y criterio de un experto habitual en el arte.

Los vectores de expresión que contienen todos los elementos necesarios para la expresión se encuentran disponibles en el mercado y los conocen los expertos en el arte. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Las células se modifican genéticamente introduciendo en las células ADN (ARN) heterólogo que codifica un polipéptido o fragmento o una variante del mismo. Este ADN (ARN) heterólogo se coloca bajo el control operable de elementos transcripcionales para permitir la expresión del ADN heterólogo en la célula huésped.

Los sistemas preferidos para la expresión de ARNm en células de mamífero son aquellos tales como pcDNA3.1 (disponible de Invitrogen, Carlsbad, CA) que contienen un marcador de selección tal como un gen que otorga resistencia a G418 (que facilita la selección de líneas celulares transfectadas de manera estable) y las secuencias potenciadoras-promotoras del citomegalovirus (CMV) humano. Adicionalmente, para la expresión en líneas celulares caninas o de primates, es apropiado el vector pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contiene un origen de replicación del virus de Epstein Barr (VEB), facilitando el mantenimiento del plásmido como un elemento extracromosómico multicopia. Otro vector de expresión también preferido es un adenovirus, descrito por Stratford- Perricaudet, que carece de proteínas E1 y E3 (J. Clin. Invest. 90: 626-630, 1992).

Las SEC ID Nos: 1 y/o 3 descritas anteriormente, los vectores de expresión que contienen la secuencia de ADNc, pueden usarse para transfectar células huéspedes y líneas celulares, siendo estas procariotas (por ejemplo, *Escherichia coli*) o eucariotas (por ejemplo, células CHO, células COS, sistemas de expresión de levaduras y expresión de baculovirus recombinante en células de insectos). Son especialmente útiles las células de mamífero tales como células de ratón, hámster, cerdo, cabra, primate, etc. Estas pueden ser de una amplia diversidad de tipos tisulares e incluyen células primarias y líneas celulares. Los ejemplos específicos incluyen células dendríticas, células U293, leucocitos de sangre periférica, células madre de la médula ósea y células madre embrionarias.

La invención puede utilizar péptidos aislados (incluyendo proteínas completas y proteínas parciales), codificados por los ácidos nucleicos anteriores (SEC ID Nos: 1 y 3) e incluye los polipéptidos de las SEC ID Nos: 2 y/o 4, y fragmentos únicos de los mismos. Dichos polipéptidos son útiles, por ejemplo, en solitario o como parte de proteínas de fusión para generar anticuerpos, como componentes de un inmunoensayo, etc. Los polipéptidos pueden aislarse de muestras biológicas que incluyen homogeneizados de tejidos o de células y también pueden expresarse de manera recombinante en una diversidad de sistemas de expresión procariotas y eucariotas construyendo un vector de expresión apropiado para el sistema de expresión, introduciendo el vector de expresión en el sistema de expresión y aislando la proteína expresada de manera recombinante. También pueden sintetizarse químicamente polipéptidos cortos, incluyendo péptidos antigénicos (tales como los presentados por las moléculas del MHC sobre la superficie de una célula para el reconocimiento inmune) usando procedimientos de síntesis de péptidos bien establecidos.

Como se usa en el presente documento, con respecto a polipéptidos, el término "aislado" significa separado de su entorno natural en forma suficientemente pura de manera que pueda manipularse o usarse para cualquiera de los fines de la invención. Por lo tanto, aislado significa suficientemente puro para su uso (i) para suscitar y/o aislar anticuerpos, (ii) como un reactivo en un ensayo, (iii) para secuenciación, (iv) como un agente terapéutico, etc.

Un fragmento único para cada uno de los polipéptidos anteriores, en general, posee los aspectos y las características de fragmentos únicos, como se ha indicado anteriormente, en relación con ácidos nucleicos. Como reconocerán los expertos en el arte, el tamaño del fragmento único dependerá de factores tales como si el fragmento constituye una parte de un dominio de proteína conservado. Por lo tanto, algunas regiones de un polipéptido requerirán que segmentos más largos sean únicos mientras que otras requerirán solamente segmentos cortos, por lo general entre 5 y 12 aminoácidos (por ejemplo 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 aminoácidos de longitud o más, incluyendo cada número entero hasta la longitud completa de cada polipéptido).

Los fragmentos únicos de un polipéptido son preferiblemente aquellos fragmentos que conservan una capacidad funcional del polipéptido distinta. Las capacidades funcionales que pueden conservarse en un fragmento único de un polipéptido incluyen la interacción con anticuerpos, interacción con otros polipéptidos o fragmentos de los mismos, interacción con otras moléculas, etc. Una actividad importante es la capacidad de actuar como una firma para identificar el polipéptido. Los expertos en el arte conocerán bien procedimientos para seleccionar secuencias únicas de aminoácidos, por lo general en base a la capacidad del fragmento único para distinguir selectivamente la secuencia de interés de miembros que no son de la familia. Por lo general, todo lo que se necesita es una comparación de la secuencia del fragmento con las de las bases de datos conocidas.

Las variantes de los polipéptidos descritos anteriormente pueden ser útiles. Como se usa en el presente documento, una "variante" de un polipéptido es un polipéptido que contiene una o más modificaciones con respecto a la secuencia de aminoácidos primaria de un polipéptido natural (por ejemplo, "de tipo silvestre": un polipéptido con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N°: 2 y 4). Las modificaciones que crean una variante polipeptídica se realizan por lo general para el ácido nucleico que codifica el polipéptido y pueden incluir deleciones, mutaciones puntuales, truncamientos, sustituciones de aminoácidos y adición de aminoácidos o de residuos no

aminoacídicos para: (1) reducir o eliminar una actividad de un polipéptido; (2) potenciar una propiedad de un polipéptido, tal como estabilidad de la proteína en un sistema de expresión o la estabilidad de la unión del ligando a la proteína; (3) proporcionar una nueva actividad o propiedad a un polipéptido, tal como adición de un epítipo antigénico o adición de un resto de detección; o (4) proporcionar unión equivalente o mejor a un receptor polipeptídico o a otra molécula. Como alternativa, pueden realizarse modificaciones directamente en el polipéptido, tales como mediante escisión, adición de una molécula de unión, adición de un resto de detección, tal como biotina, adición de un ácido graso, y similares. Las modificaciones también abarcan proteínas de fusión que comprenden toda o parte de la secuencia de aminoácidos del polipéptido. Un experto en el arte estará familiarizado con procedimientos para predecir el efecto sobre la conformación de proteínas de un cambio en la secuencia de la proteína y puede por lo tanto “diseñar” un polipéptido variante de acuerdo con procedimientos conocidos. Un ejemplo de dicho procedimiento lo describen Dahiyat and Mayo in Science 278:82-87, 1997, mediante el cual las proteínas pueden diseñarse *de novo*. El procedimiento puede aplicarse a una proteína conocida para variar solamente una parte de la secuencia polipeptídica. Aplicando los procedimientos informáticos de Dahiyat and Mayo, pueden proponerse variantes específicas de cualquiera de los polipéptidos anteriores y realizar ensayos para determinar si la variante conserva una conformación deseada.

Las variantes pueden incluir polipéptidos que se modifican específicamente para modificar un aspecto del polipéptido no relacionado con su actividad fisiológica. Por ejemplo, pueden sustituirse o deleccionarse residuos de cisteína, para impedir enlaces disulfuro no deseados. De manera similar, algunos aminoácidos pueden cambiarse para potenciar la expresión de un polipéptido eliminando la proteólisis por proteasas en un sistema de expresión (por ejemplo, residuos de aminoácidos dibásicos en sistemas de expresión de levaduras en los que está presente la actividad proteasa KEX2).

Preferiblemente, las mutaciones de un ácido nucleico que codifica un polipéptido conservan el marco de lectura aminoacídico de la secuencia codificante y preferiblemente no crean regiones en el ácido nucleico que probablemente se hibridan para formar estructuras secundarias, tales como horquillas o bucles, que pueden ser perjudiciales para la expresión del polipéptido variante.

Las mutaciones pueden realizarse seleccionando una sustitución aminoacídica o por mutagénesis al azar de un sitio seleccionado en un ácido nucleico que codifica el polipéptido. Después los polipéptidos variantes se expresan y se ensayan para una o más actividades para determinar que mutación proporciona un polipéptido variante con las propiedades deseadas. Pueden realizarse otras mutaciones para variantes (o para polipéptidos no variantes) que sean silenciosas como para la secuencia de aminoácidos del polipéptido, pero que proporcionen codones preferidos para la traducción en un huésped particular. Los expertos habituales en el arte conocen bien codones preferidos para la traducción de un ácido nucleico, por ejemplo, en *Escherichia coli*. Para potenciar la expresión del polipéptido, pueden realizarse otras mutaciones adicionales con respecto a las secuencias no codificantes de un gen o clon de ADNc.

El experto en el arte se percatará que, en cualquiera de los polipéptidos anteriores, pueden hacerse sustituciones aminoacídicas conservativas, para proporcionar variantes funcionalmente equivalentes de los polipéptidos anteriores, esto es, las variantes conservan las capacidades funcionales de cada polipéptido. Como se usa en el presente documento, una “sustitución aminoacídica conservativa” se refiere a una sustitución aminoacídica que no modifica significativamente la estructura terciaria y/o la actividad del polipéptido. Las variantes pueden prepararse de acuerdo con procedimientos conocidos por un experto habitual en el arte para modificar la secuencia polipeptídica e incluyen los que se encuentran en referencias que recopilan dichos procedimientos, por ejemplo Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, o Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Las sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen sustituciones realizadas entre aminoácidos dentro de los siguientes grupos: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; y (g) E, D.

Por lo tanto, se contemplan variantes de polipéptidos funcionalmente equivalentes, esto es, variantes de polipéptidos que conservan la función de los polipéptidos naturales (“de tipo silvestre”). Las sustituciones conservativas de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de polipéptidos para producir variantes funcionalmente equivalentes de cada polipéptido por lo general se realizan por modificación de un ácido nucleico que codifica el polipéptido. Dichas sustituciones pueden realizarse mediante una diversidad de procedimientos conocidos por un experto habitual en el arte. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse mediante mutación dirigida por PCR, mutagénesis dirigida de acuerdo con el procedimiento de Kunkel (Kunkel, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 82: 488-492, 1985), o mediante síntesis química de un gen que codifica un polipéptido. La actividad de fragmentos de polipéptidos funcionalmente equivalentes puede ensayarse clonando el gen que codifica el polipéptido modificado en un vector de expresión bacteriano o de mamífero, introduciendo el vector en una célula huésped apropiada, expresando el polipéptido modificado y ensayando para determinar una capacidad funcional de los polipéptidos como se describe en el presente documento.

Para obtener moléculas aisladas, pueden utilizarse diversas metodologías bien conocidas por los expertos en el arte. El polipéptido puede purificarse a partir de células que producen el polipéptido de manera natural por medios cromatográficos o por reconocimiento inmunológico. Como alternativa, para ocasionar la producción del polipéptido, en

5 las células puede introducirse un vector de expresión. En otro procedimiento, para ocasionar la producción del polipéptido codificado, pueden microinyectarse transcritos de ARNm o introducirse en las células de otra manera. Para producir polipéptidos, también puede usarse la traducción de ARNm en extractos acelulares, tales como el sistema de lisado de reticulocitos. Los expertos en el arte también pueden seguir fácilmente procedimientos conocidos para aislar polipéptidos. Estos incluyen, pero sin limitación, inmunocromatografía, HPLC, cromatografía por exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de inmovilización.

10 El aislamiento de los ADNc descritos también hace posible que el experto diagnostique un trastorno caracterizado por una expresión aberrante de cualquiera de los ADNc anteriores. Estos procedimientos implican determinar la expresión de cada uno de los ácidos nucleicos identificados y/o de los polipéptidos derivados de los mismos. En el primer caso dichas determinaciones pueden realizarse mediante cualquier ensayo convencional de determinación de ácidos nucleicos, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa o ensayando con sondas de hibridación marcadas como se ilustra más adelante. En el segundo caso, dicha determinación puede realizarse mediante cualquier ensayo inmunológico convencional usando, por ejemplo, anticuerpos que se unen a la proteína secretada.

15 La invención también puede usar agentes de unión peptídicos aislados que pueden ser, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos ("polipéptidos de unión"), que tienen la capacidad de unirse selectivamente a cualquiera de los polipéptidos descritos (por ejemplo, SEC ID N°: 2). Los anticuerpos incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales, preparados de acuerdo con metodología convencional.

20 Significativamente, como se conoce bien en la materia, solo una pequeña parte de una molécula de anticuerpo, el paratopo, está implicada en la unión del anticuerpo a su epítope (véase, en general, Clark, W. R. (1986) *The Experimental Foundations of Modern Immunology* Wiley & Sons, Inc., Nueva York; Roitt, I. (1991) *Essential Immunology*, 7ª Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford). Las regiones pFc' y Fc, por ejemplo, son efectoras de la cascada complementaria pero no están implicadas en la unión al antígeno. Un anticuerpo a partir del cual se ha escindido enzimáticamente la región pFc' o que se ha producido sin la región pFc', denominado fragmento F(ab')₂, conserva los dos sitios de unión al antígeno de un anticuerpo intacto. De manera similar, un anticuerpo a partir del cual la región Fc se ha escindido enzimáticamente, o que se ha producido sin la región Fc, denominado fragmento Fab, conserva uno de los sitios de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo intacta. Continuando adicionalmente, los fragmentos Fab constan de una cadena ligera de anticuerpo unida covalentemente y una parte de la cadena pesada de anticuerpo denominada Fd. Los fragmentos Fd son el principal determinante de especificidad de anticuerpo (un solo fragmento Fd puede asociarse con hasta diez cadenas ligeras diferentes sin modificar la especificidad del anticuerpo) y los fragmentos Fd conservan la capacidad de unión al epítope en aislamiento.

35 Dentro de la parte de unión al antígeno de un anticuerpo, como se conoce bien en la materia, existen regiones determinantes de la complementariedad (RDC), que interaccionan directamente con el epítope del antígeno y regiones marco conservadas (MC), que conservan la estructura terciaria del paratopo (véase, en líneas generales, Clark, 1986; Roitt, 1991). Tanto en el fragmento Fd de cadena pesada como en la cadena ligera de las inmunoglobulinas IgG, existen cuatro regiones marco conservadas (MC1 a MC4) separadas respectivamente por tres regiones determinantes de la complementariedad (RDC1 a RDC3). Las RDC, y en particular las regiones RDC3, y más particularmente la RDC3 de cadena pesada, son principalmente responsables de la especificidad del anticuerpo.

40 Está bien establecido en la materia que las regiones no RDC de un anticuerpo de mamífero puedan sustituirse por regiones similares de anticuerpos coespecíficos o heteroespecíficos conservando al mismo tiempo la especificidad epitópica del anticuerpo original. Esto se pone más claramente de manifiesto en el desarrollo y uso de anticuerpos "humanizados" en los que las RDC no humanas se unen covalentemente a regiones RMC y/o a Fc/pFc' para producir un anticuerpo funcional. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos 4.816.567; 5.225.539; 5.585.089; 5.693.762 y 5.859.205. Por lo tanto, por ejemplo, la Publicación Internacional PCT Número WO 92/04381 enseña la producción y uso de anticuerpos SRV murinos humanizados en los que al menos una parte de las regiones MC murinas se han sustituido por regiones MC de origen humano. Dichos anticuerpos, incluyendo los fragmentos de anticuerpos intactos con capacidad de unirse al antígeno, se denominan frecuentemente anticuerpos "quiméricos".

50 Por lo tanto, como será evidente para un experto habitual en el arte, la presente invención puede utilizar fragmentos F(ab')₂, Fab, Fv y Fd; anticuerpos quiméricos, en los que las regiones Fc y/o MC y/o RDC1 y/o RDC2 y/o RDC3 de cadena ligera pueden reemplazarse por secuencias homólogas humanas o no humanas; anticuerpos de fragmentos F(ab')₂ quiméricos en los que las regiones MC y/o RDC1 y/o RDC2 y/o RDC3 de cadena ligera se han reemplazado por secuencias homólogas humanas o no humanas; anticuerpos de fragmentos Fab quiméricos en los que las regiones MC y/o RDC1 y/o RDC2 y/o RDC3 de cadena ligera se han reemplazado por secuencias homólogas humanas o no humanas; y anticuerpos de fragmentos Fd quiméricos en los que las regiones MC y/o RDC1 y/o RDC2 se han reemplazado por secuencias homólogas humanas o no humanas. La presente invención también puede usar anticuerpos denominados monocatenarios.

Por lo tanto, la invención puede implicar polipéptidos de numerosos tamaños y tipos que se unen específicamente a polipéptidos de la invención (por ejemplo, a la SEC ID N°: 2) y formar complejos tanto con polipéptidos como con sus socios de unión. Estos polipéptidos también pueden derivar de fuentes distintas de la tecnología de anticuerpos. Por ejemplo, dichos agentes de unión polipeptídicos pueden proporcionarse a partir de bibliotecas de péptidos degenerados que pueden prepararse fácilmente en solución, en forma inmovilizada, como bibliotecas de presentación de péptidos de flagelos bacterianos o como bibliotecas de presentación de fagos. Las bibliotecas combinatoriales también pueden sintetizarse de péptidos que contienen uno o más aminoácidos. Adicionalmente las bibliotecas pueden sintetizarse de unidades estructurales de síntesis peptídicas y no peptídicas.

“Expresión aberrante” se refiere a expresión disminuida (infraexpresión) o expresión aumentada (sobreexpresión) de cualquiera de las moléculas de IL1RL-1 anteriores (ácidos nucleicos y/o polipéptidos) en comparación con un control (esto es, expresión de la misma molécula en un sujeto sano o “normal”). Un “sujeto sano”, como se usa en el presente documento, se refiere a un sujeto que no está en riesgo de desarrollar ninguna afección cardiovascular futura (véase el análisis anterior y Harrison’s Principles of Experimental Medicine, 13ª Edición, McGraw-Hill, Inc., N. Y. - en los sucesivos en el presente documento “Harrison”). Además, los sujetos sanos no presentan de otra manera síntomas de la enfermedad. En otras palabras, si a dichos sujetos los examina un médico profesional, se caracterizarían como sanos y sin síntomas de ningún trastorno cardiovascular o riesgo de desarrollar ningún trastorno cardiovascular.

Cuando el trastorno es una afección cardiovascular seleccionada del grupo que consiste en infarto de miocardio e insuficiencia cardíaca, la expresión disminuida de cualquiera de las moléculas anteriores en comparación con un control (por ejemplo, un sujeto sano) es indicadora de la presencia del trastorno, o indicadora del riesgo a desarrollar dicho trastorno en el futuro.

Los kits pueden ser utilizados para medir los niveles de los ácidos nucleicos de la invención, o productos de expresión de la invención.

La invención abarca un procedimiento *in vitro* para evaluar la probabilidad de que un sujeto se beneficiará del tratamiento con un agente para reducir el riesgo de una afección cardiovascular. El agente se selecciona del grupo que consiste en un agente antiinflamatorio, un agente antitrombótico, un agente antiplaquetario, un agente fibrinolítico, un agente hipolipemiente, un inhibidor directo de la trombina, un inhibidor del receptor de glicoproteína IIb/IIIa, un anticuerpo de molécula de adhesión anti-celular monoclonal o policlonal que inhibe la capacidad de los leucocitos para unir a las moléculas de adhesión celular, un bloqueador del canal de calcio, un bloqueador del receptor beta-adrenérgico, un inhibidor de la ciclooxigenasa-2 y un inhibidor del sistema de angiotensina. El procedimiento implica la obtención de un primer nivel de una proteína IL1RL-1 soluble en una muestra de un sujeto, y la comparación del nivel de la proteína IL1RL-1 soluble a un valor predeterminado específico para el diagnóstico de una afección cardiovascular. El nivel de la molécula IL1RL-1 en comparación con el valor predeterminado es indicativo de si el sujeto se beneficiará del tratamiento con dicho agente. En ciertas realizaciones, el valor predeterminado específico para el diagnóstico de una afección cardiovascular es una pluralidad de intervalos de nivel marcador predeterminados y dicha etapa de comparación comprende determinar en cual, de dichos intervalos de nivel del marcador predeterminado, se incluye el nivel de dichos sujetos. La afección cardiovascular puede ser una afección seleccionada del grupo que consiste en infarto de miocardio e insuficiencia cardíaca.

El valor predeterminado específico para el diagnóstico de una afección cardiovascular es un solo valor de límite, tal como una mediana o media. Este puede establecerse en base a grupos comparativos, de tal manera que cuando en un grupo se define el riesgo en otro grupo definido el riesgo es doble. Este puede ser un intervalo, por ejemplo, en el que la población sometida a ensayo se divide en partes iguales (o desiguales) en grupos, tal como un grupo de riesgo bajo, un grupo de riesgo medio, y un grupo de riesgo alto o en cuadrantes, siendo el cuadrante más bajo los sujetos con el riesgo más bajo y el cuadrante más alto los sujetos con el riesgo más alto.

El valor predeterminado puede depender de la población particular seleccionada. Por ejemplo, una población aparentemente sana (sin enfermedad detectable y sin historial previo de un trastorno cardiovascular) tendrá un intervalo “normal” diferente de marcadores de inflamación sistémica al que tendría una población fumadora o una población de miembros que ha padecido anteriormente un trastorno cardiovascular. Por consiguiente, los valores predeterminados seleccionados pueden tener en cuenta la categoría en la que se encuentran los sujetos. Un experto habitual en el arte, puede seleccionar, solo con experimentación rutinaria, los intervalos y categorías apropiados.

Como se discutió anteriormente, la invención proporciona un método para evaluar la probabilidad de que un sujeto se beneficiará del tratamiento con un agente para reducir el riesgo de un trastorno cardiovascular futuro. Este método tiene implicaciones importantes para el tratamiento del paciente y también para el desarrollo clínico de nuevos agentes terapéuticos. Los médicos seleccionan regímenes terapéuticos para el tratamiento del paciente en base a los beneficios netos esperados para el paciente. El beneficio neto se deriva de la relación riesgo-beneficio. La presente invención permite la selección de los sujetos que tienen más probabilidades de beneficiarse de la intervención, ayudando de esta manera al médico en la selección de un régimen terapéutico. Esto podría incluir el uso de fármacos con un mayor perfil

de riesgo donde ha aumentado la probabilidad de beneficio esperado. Del mismo modo, los investigadores clínicos desean seleccionar para ensayos clínicos una población con una alta probabilidad de obtener un beneficio neto. La presente invención puede ayudar a los investigadores clínicos a seleccionar esos sujetos. Se espera que los investigadores clínicos ahora utilicen la presente invención para la determinación de los criterios de entrada para los ensayos clínicos.

El "infarto de miocardio" es un foco de necrosis resultante de perfusión inadecuada del tejido cardiaco. El infarto de miocardio generalmente se produce por una disminución brusca del flujo sanguíneo coronario al que sigue una oclusión trombótica de una arteria coronaria previamente estrechada por aterosclerosis. Generalmente, el infarto se produce cuando se fisura, se rompe o se ulcera una placa aterosclerótica y se forma un trombo mural lo que conduce a oclusión arterial coronaria.

El diagnóstico de infarto de miocardio en un sujeto determina la necesidad de tratar al sujeto. En Harrison, por ejemplo, se describen diversos ensayos de laboratorio, bien conocidos en la materia. Generalmente, los ensayos pueden dividirse en cuatro categorías principales: (1) índices no específicos de necrosis e inflamación tisular (2) electrocardiogramas, (3) cambios enzimáticos en suero (por ejemplo, niveles de creatina fosfoquinasa) y (4) formación de imágenes cardiacas. Un experto habitual en el arte podrá aplicar fácilmente cualquiera de los ensayos anteriores para determinar cuándo un sujeto está en riesgo, padece o ha padecido un infarto de miocardio. Además, el aumento de los niveles de expresión de una molécula de ácido nucleico 1L1RL-1, o un producto de expresión de los mismos, también son factores de riesgo importantes.

La insuficiencia cardíaca es un síndrome clínico de diversas etiologías unidos por el denominador común de la alteración de bombeo del corazón y se caracteriza por la incapacidad del corazón para bombear la sangre en consonancia con los requisitos metabólicos de los tejidos, o hacerlo sólo a partir de un elevador la presión de llenado.

Los agentes "antiinflamatorios" incluyen alclofenaco; alclometasona dipropionato; algestona acetónido; alfa-amilasa; amcinafal; amcinafida; amfenaco sódico; amiprilosa clorhidrato; anakinra; aniolac; anitrazafen; apazona; balsalazida disódico; bendazac; benoxaprofeno; bencidamina clorhidrato; bromelains; broperamola; budesonida; carprofeno; cicloprofeno; cintazona; cliprofeno; propionato de clobetasol; butirato de clobetasona; clopirac; cloticasona propionato; cormetasona acetato; cortodoxona; deflazacort; desonide; desoximetasona; dexametasona dipropionato; diclofenaco potasio; diclofenaco sódico; diflorasona diacetato; diflumidona de sodio; diflunisal; difluprednato; diflazona; dimetilsulfóxido; drocinonida; endrisona; enlimomab; enolicam de sodio; epirizol; etodolaco; etofenamato; felbinaco; fenamole; fenbufen; fenclofenaco; fenclorac; fendosal; fempipalona; fentiazaco; flazalona; fluazacort; ácido flufenámico; flumizol; acetato de flunisolida; flunixinina; flunixinina meglumina; fluocortina butilo; acetato de fluorometolona; fluquazona; flurbiprofeno; fluretifen; propionato de fluticasona; furaprofen; furobufen; halcinonida; halobetasol propionato; acetato de halopredona; ibufenaco; ibuprofeno; ibuprofeno aluminio; ibuprofeno piconol; ilonidap; indometacina; indometacina sódica; indoprofeno; indoxol; intrazol; acetato de isoflupredona; isoxepaco; isoxicam; ketoprofeno; lofemazole clorhidrato; lornoxicam; etabonato de loteprednol; meclofenamato sódico; ácido meclofenámico; meclorisone dibutirato; ácido mefenámico; mesalamina; meseclazona; metilprednisolona suleptanato; momiflumato; nabumetona; naproxeno; naproxeno sódico; naproxol; nimazona; sodio olsalazina; orgotein; orpanoxin; oxaprozina; oxifenbutazona; paranyline clorhidrato; pentosano polisulfato de sodio; fenbutazona glicerato de sodio; pifenidona; piroxicam; piroxicam cinamato; piroxicam olamina; piroprofeno; prednazato; prifelona; ácido prodolico; procuazona; proxazol; citrato de proxazol; rimexolona; romazarit; salcolex; salnacedin; salsalato; salicilatos; sanguinarium cloruro; seclazona; sermetacina; sudoxicam; sulindac; suprofen; talmetacina; talniflumato; talosalato; tebufelona; tenidap; tenidap sódico; tenoxicam; tesicam; tesimida; tetridamina; tiopinaco; pivalato de tixocortol; tolmetina; tolmetina de sodio; triclonida; triflumidato; zidometacina; glucocorticoides; y zomepirac sódico. Un agente antiinflamatorio preferido es la aspirina.

Agentes "anti-trombótico" y/o "fibrinolítico" incluyen plasminógeno (plasmina a través de interacciones de precalicreína, quininógenos, Factores XII, XIIIa, proactivador de plasminógeno y activador del plasminógeno tisular [TPA]) estreptoquinasa; uroquinasa; anisoilado; complejo activador de plasminógeno-estreptoquinasa; Pro-uroquinasa; (Pro-UK); rTPA (alteplasa o activasa; "r" denota recombinante); rPro-UK; Abbokinase; eminas; clorhidrato de Sreptase Anagrelide; bivalirudina; dalteparina sódica; danaparoide sódico; dazoxiben clorhidrato; efegatran sulfato; enoxaparina sódica; ifetroban; ifetroban sódico; tinzaparin de sodio; retaplase; trifenagrel; warfarina; y dextranos.

"Agentes antiplaquetarios" incluyen clopidogrel; sulfpirazona; aspirina; dipiridamol; clofibrato; piridinol carbamato; PGE; glucagón; fármaco de antiserotonina; cafeína; teofilina pentoxifilina; ticlopidina; y anagrelida.

Agentes "hipolipemiantes" incluyen gemfibrozil, colestiramina, colestipol, ácido nicotínico, probucol lovastatina, fluvastatina, simvastatina, atorvastatina, pravastatina, y cerivastatina.

"Inhibidores directos de la trombina" incluyen hirudina, hirúgeno, hirulog, agatroban, PPACK, y aptámeros de trombina.

"Inhibidores del receptor de la glucoproteína IIb/IIIa" abarcan tanto los anticuerpos como los no anticuerpos, e incluyen, pero no se limitan, a ReoPro (abcixamab), lamifibán, y tirofiban.

"Bloqueadores de los canales de calcio" son una clase químicamente diferente de compuestos que tienen un importante valor terapéutico en el control de una variedad de enfermedades incluyendo varios trastornos cardiovasculares, tales como hipertensión, angina de pecho, y arritmias cardíacas (Fleckenstein, *Cir. Res.* v. 52, (suppl. 1), p.13-16 (1983); Fleckenstein, *Experimental Facts and Therapeutic Prospects*, John Wiley, New York (1983); McCall, D., *Curr Pract Cardiol*, v. 10, p. 1-11 (1985)). Los bloqueadores de los canales de calcio son un grupo heterogéneo de fármacos que previenen o retardan la entrada de calcio en las células mediante la regulación de los canales de calcio celulares. (Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*, Nineteenth Edition, Mack Publishing Company, Eaton, PA, p.963 (1995)). La mayoría de los bloqueadores de los canales de calcio actualmente disponibles, y útiles de acuerdo con la presente invención, pertenecen a uno de los tres principales grupos químicos de los fármacos, las dihidropiridinas tales como nifedipino, las aminas de fenil alquilo, tales como verapamil, y las benzotiazepinas, tales como diltiazem. Otros bloqueadores de los canales de calcio útiles de acuerdo con la invención, incluyen, pero no se limitan a, amrinona, amlodipino, benciclano, felodipino, fendilina, flunarizina, isradipino, nicardipino, nimodipino, perhexileno, galopamil, tiapamil y análogos de tiapamil (como 1993RO-11 -2933), fenitoína, barbitúricos y los péptidos dinorfina, omega-conotoxina, y omega-agatoxina, y similares, y/o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

"Agentes de bloqueo de receptores beta-adrenérgicos" son una clase de fármacos que antagonizan los efectos cardiovasculares de catecolaminas en la angina de pecho, hipertensión, y arritmias cardíacas. Los bloqueadores de los receptores beta-adrenérgicos incluyen, pero no se limitan a, atenolol, acebutolol, alprenolol, befunolol, betaxolol, bunitolol, carteolol, celiprolol, hedroxalol, indenolol, labetalol, levobunolol, mepindolol, metipranolol, metindolol, metoprolol, metrizoranolol, oxprenolol, pindolol, propranolol, practolol, practolol, sotalolnadolol, tiprenolol, tomalolol, timolol, bupranolol, penbutolol, trimepranol, 2-(3-(1,1-dimetiletil)-amino-2-hidroxi-propoxi)-3-piridenocarbonitrilo HCl, 1-butilamino-3-(2,5-dichlorofenoxi)-2-propanol, 1-isopropilamino-3-(4-(2-ciclopropilmetoxietil)fenoxi)-2-propanol, 3-isopropilamino-1-(7-metilindan-4-iloxi)-2-butanol, 2-(3-t-butilamino-2-hidroxi-propiltio)-4-(5-carbamoil-2-tienil)tiazol, 7-(2-hidroxi-3-tbutilaminpropoxi) ftalida. Los compuestos identificados anteriormente se pueden utilizar como mezclas de isómeros, o en sus respectivas forma levógira o dextrógira.

La ciclooxigenasa-2 (COX-2) es una forma identificada recientemente de un ciclooxigenasa. La "ciclooxigenasa" es un complejo de enzima presente en la mayoría de los tejidos que produce varias prostaglandinas y tromboxanos a partir del ácido araquidónico. Los fármacos no esteroideos, antiinflamatorios ejercen la mayor parte de su actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética e inhiben las contracciones uterinas inducidas por hormonas y ciertos tipos de crecimiento de cáncer a través de la inhibición de la ciclooxigenasa (también conocida como prostaglandina G/H sintasa y/o Prostaglandina sintasa endoperóxido). Inicialmente, sólo una forma de la ciclooxigenasa era conocida, la "enzima constitutiva" o ciclooxigenasa-1 (COX-1). Esta y se identificó originalmente en vesículas seminales bovinas.

La ciclooxigenasa-2 (COX-2) se ha clonado, secuenciado y caracterizado inicialmente a partir de fuentes de pollo, murino y humanas (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,543,297, expedida el 6 de agosto de 1996 de Cromlish et al., y asignada a Merck Frosst Canada, Inc., Kirkland, CA, titulada: "Human cyclooxygenase-2 cDNA and assays for evaluating cyclooxygenase-2 activity"). Esta enzima es distinta de la COX-1. COX-2 es inducible rápida y fácilmente por una serie de agentes incluyendo mitógenos, endotoxinas, hormonas, citoquinas y factores de crecimiento. Como las prostaglandinas tienen tanto papeles fisiológicos y patológicos, la enzima constitutiva, COX-1, es responsable, en gran parte, de la liberación basal endógena de prostaglandinas y por lo tanto es importante en sus funciones fisiológicas tales como el mantenimiento de la integridad gastrointestinal y el flujo sanguíneo renal. Por el contrario, se cree que la forma inducible, COX-2, es principalmente responsable de los efectos patológicos de prostaglandinas donde la rápida inducción de la enzima podría ocurrir en respuesta a tales agentes como agentes inflamatorios, hormonas, factores de crecimiento y citoquinas. Por lo tanto, se cree que un inhibidor selectivo de COX-2 tiene similares propiedades antiinflamatorias, antipiréticas y analgésicas a un fármaco antiinflamatorio no esteroideo convencional, y además inhibe las contracciones uterinas inducidas por hormonas y también tiene efectos anticancerígenos potenciales, pero con efectos secundarios reducidos. En particular, dichos inhibidores de la COX-2 se cree que tienen un potencial reducido de toxicidad gastrointestinal, un potencial reducido de efectos secundarios renales, un efecto reducido sobre los tiempos de sangrado y posiblemente una disminución del potencial para inducir ataques de asma en sujetos asmáticos sensibles a la aspirina, y por lo tanto son útiles de acuerdo con la presente invención.

Una serie de "inhibidores de la COX-2" selectivos son conocidos en la materia. Estos incluyen, pero no se limitan a, inhibidores COX-2 descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 5,474,995 "Phenyl heterocycles as COX-2 inhibitors"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,521,213 "Diaryl bicyclic heterocycles as inhibitors of cyclooxygenase-2"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,536,752 "Phenyl heterocycles as COX-2 inhibitors"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,550,142 "Phenyl heterocycles as COX-2 inhibitors"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,552,422 "Aryl substituted 5,5 fused aromatic nitrogen compounds as anti-inflammatory agents"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,604,253 "NBenzyindol-3-yl propanoic acid derivatives as ciclooxigenase inhibitors"; la Patente de los Estados Unidos

No. 5,604,260 "5-Methanesulfonamido-1-indanones as an inhibitor of cyclooxygenase-2"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,639,780 N-Benzyl indol-3-yl butanoic acid derivatives as cyclooxygenase inhibitors"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,677,318 Diphenyl-1,2-3-thiadiazoles as anti-inflammatory agents"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,691,374 "Diaryl-5-oxygenated-2-(5H)-furanones as COX-2 inhibitors"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,698,584 "3,4-Diaryl-2-hydroxy-2,5-dihydrofurans as prodrugs to COX-2 inhibitors"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,710,140 "Phenyl heterocycles as COX-2 inhibitors"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,733,909 "Diphenyl stilbenes as prodrugs to COX-2 inhibitors"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,789,413 "Alkylated styrenes as prodrugs to COX-2 inhibitors"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,817,700 "Bisaryl cyclobutenes derivatives as cyclooxygenase inhibitors"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,849,943 "Stilbene derivatives useful as cyclooxygenase-2 inhibitors"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,861,419 "Substituted pyridines as selective cyclooxygenase-2 inhibitors"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,922,742 "Pyridinyl-2-cyclopenten-1-ones as selective cyclooxygenase-2 inhibitors"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,925,631 "Alkylated styrenes as prodrugs to COX-2 inhibitors"; all of which are commonly asignada a Merck Frosst Canada, Inc. (Kirkland, CA o Merck & Co., Inc. (Rahway, NJ). También se describen inhibidores de COX-2 adicionales en la Patente de los Estados Unidos No. 5,643,933, asignada a G. D. Searle & Co. (Skokie, IL), titulada: "Substituted sulfonylphenylheterocycles as cyclooxygenase-2 y 5-lipoxygenase inhibitors."

Un número de los inhibidores de la COX-2 identificados anteriormente son profármacos de inhibidores selectivos de la COX-2, y ejercen su acción mediante la conversión *in vivo* a los inhibidores activos y selectivos de la COX-2. Los inhibidores activos y selectivos de la COX-2 formados a partir profármacos de inhibidores de la COX-2 de identificadas anteriormente se describen en detalle en WO 95/00501, publicado el 5 de enero, 1995, WO 95/18799, publicado 13 de julio, 1995 y la Patente de los Estados Unidos No. 5,474,995, expedida el 12 de diciembre de 1995. Dadas las instrucciones de la Patente de los Estados Unidos No. 5,543,297, titulada: "Human cyclooxygenase-2 cDNA and assays for evaluating cyclooxygenase-2 activity," un experto habitual en el arte sería capaz de determinar si un agente es un inhibidor selectivo de COX-2 o un precursor de un inhibidor de COX-2, y por lo tanto parte de la presente invención.

Un "inhibidor del sistema de angiotensina" es un agente que interfiere con la función, la síntesis o catabolismo de la angiotensina II. Estos agentes incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), antagonistas de la angiotensina II, antagonistas del receptor de la angiotensina II, agentes que activan el catabolismo de la angiotensina II, y agentes que impiden la síntesis de la angiotensina I de la que la angiotensina II se deriva en última instancia. El sistema renina-angiotensina está implicado en la regulación de la hemodinámica y el equilibrio hidroelectrolítico. Los factores que disminuyen el volumen de sangre, presión de perfusión renal o la concentración de Na⁺ en el plasma tienden a activar el sistema, mientras que los factores que aumentan estos parámetros tienden a suprimir su función.

La angiotensina I y angiotensina II son sintetizadas por la ruta enzimática de la renina-angiotensina. El proceso de síntesis se inicia cuando la enzima renina actúa sobre angiotensinógeno, una pseudoglobulina en el plasma sanguíneo, para producir el decapeptido angiotensina I. La angiotensina I se convierte por la enzima convertidora de angiotensina (ACE) en angiotensina II (angiotensina- [1-8] octapeptido). Esta última es una sustancia presora activa que se ha implicado como agente causante en varias formas de hipertensión en diversas especies de mamíferos, por ejemplo, seres humanos.

Los inhibidores del sistema de la angiotensina (renina-angiotensina) son los compuestos que actúan para interferir con la producción de angiotensina II a partir de angiotensinógeno o angiotensina I o interferir con la actividad de angiotensina II. Tales inhibidores son bien conocidos para los expertos habituales en el arte e incluyen compuestos que actúan para inhibir las enzimas implicadas en la producción final de la angiotensina II, incluyendo renina y ACE. También incluyen compuestos que interfieren con la actividad de angiotensina II, una vez producidos. Ejemplos de clases de dichos compuestos incluyen anticuerpos (por ejemplo, a renina), aminoácidos y análogos de los mismos (incluidos los conjugados a moléculas más grandes), péptidos (incluyendo los análogos de péptidos de angiotensina y angiotensina I), análogos relacionados pro-renina, etc. Entre los inhibidores del sistema renina-angiotensina más potentes y útiles son inhibidores de la renina, inhibidores de ACE y antagonistas de la angiotensina II.

Los "antagonistas de la angiotensina II" son compuestos que interfieren con la actividad de la angiotensina II mediante la unión a receptores de la angiotensina II y que interfieren con su actividad. Los antagonistas de angiotensina II son bien conocidos e incluyen compuestos peptídicos y compuestos no peptídicos. La mayoría de los antagonistas de la angiotensina II son congéneres modificados ligeramente en el que la actividad agonista es atenuada por la sustitución de fenilalanina en la posición 8 con algún otro aminoácido; la estabilidad se puede mejorar por otros reemplazos que la degeneración lenta *in vivo*. Los ejemplos de antagonistas de angiotensina II incluyen: compuestos peptídicos (por ejemplo, saralasin, [(San¹)(Val⁵)(Ala⁸)] angiotensina-(1-8) octapeptido y análogos relacionados); imidazol-2-ona N-sustituidos (la Patente de los Estados Unidos No. 5,087,634); derivados de acetato de imidazol, incluyendo 2-N-butil-4-cloro-1- (2-clorobencilo), ácido imidazol-5-acético (véase Long et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 247(1), 1-7 (1988)); ácido 4, 5, 6, 7-tetrahydro-1Himidazo [4, 5-c] piridina-6-carboxílico y derivados análogos (Patente de los Estados Unidos No. 4,816,463); análogos N2-tetrazol beta-glucuronida (Patente de los Estados Unidos No. 5,085,992); sustituidos pirroles,

pirazoles, y triazoles (Patente de los Estados Unidos No. 5,081,127); derivados de fenol y heterocíclicos, tales como 1, 3-imidazoles (Patente de los Estados Unidos No. 5,073,566); heterociclos de anillos de 7 miembros imidazo fusionados (Patente de los Estados Unidos No. 5,064,825); péptidos (por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4,772,684); anticuerpos contra la angiotensina II (por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 4,302,386); y compuestos de imidazol aralquilo tales como imidazoles bifenilo-metil sustituidos (por ejemplo, EP Número 253,310, 20 de enero de 1988); ES8891 (N-morfolinoacetil- (- 1-naftil) -L-alanil (4, tiazolil) -L-alanil (35, 45)- 4-amino-3-hidroxi-5-ciclohexapentanoil-N-hexilamida, Sankyo Company, Ltd., Tokio, Japón); SKF108566 (ácido E-alfa-2- [2-butil-1- (carboxifenil) metil] 1H-imidazol-5-il [metilano] -2-tiofenopropanoico, Smith Kline Beecham Pharmaceuticals, PA); Losartán (DUP753/MK954, DuPont Merck Pharmaceutical Company); Remikirin (RO42-5892, F. Hoffman LaRoche AG); agonistas A2 (Marion Merrill Dow) y ciertos heterociclos no peptídicos (G.D.Searle and Company).

"Enzima convertidora de angiotensina," (ACE), es una enzima que cataliza la conversión de angiotensina I en angiotensina II. Los inhibidores de la ACE incluyen aminoácidos y sus derivados, péptidos, incluyendo di- y tripéptidos y anticuerpos a ACE que intervienen en el sistema renina-angiotensina mediante la inhibición de la actividad de ACE reduciendo o eliminando así, la formación de angiotensina II hipertensora. Los inhibidores de la ACE se han usado en medicina para tratar la hipertensión, insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio y enfermedad renal. Las clases de compuestos conocidos por ser útiles como inhibidores de la ACE incluyen acilmercapto y mercaptoalcanoil prolinas tales como captopril (Patente de los Estados Unidos No. 4,105,776) y zofenopril (Patente de los Estados Unidos Número 4,316,906), dipéptidos carboxialquilo tales como enalapril Patente de los Estados Unidos No. 4,374,829), lisinopril (Patente de los Estados Unidos No. 4,374,829), quinapril (Patente de los Estados Unidos No. 4,344,949), ramipril (Patente de los Estados Unidos No. 4,587,258), y perindopril (Patente de los Estados Unidos No. 4,508,729), dipéptidos carboxialquilo mimico tales como cilazapril (Patente de los Estados Unidos No. 4,512,924) y benazapril (Patente de los Estados Unidos No. 4,410,520), fosfinilalcanoil prolinas como fosinopril (Patente de los Estados Unidos No. 4,337,201) y trandolopril.

Los "inhibidores de la renina" son compuestos que interfieren con la actividad de la renina. Los inhibidores de la renina incluyen aminoácidos y derivados de los mismos, péptidos y derivados de los mismos, y anticuerpos para la renina. Ejemplos de inhibidores de renina que son el tema de las Patentes de los Estados Unidos son los siguientes: derivados de urea de péptidos (Patente de los Estados Unidos No. 5,116,835); aminoácidos conectados por enlaces no peptídicos (Patente de los Estados Unidos No. 5,114,937); derivados de di- y tri-péptidos (Patente de los Estados Unidos No. 5,106,835); aminoácidos y derivados de los mismos (Patente de los Estados Unidos Nos. 5,104,869 y 5,095,119); diol sulfonamidas y sulfínulos (Patente de los Estados Unidos No. 5,098,924); péptidos modificados (Patente de los Estados Unidos No. 5,095,006); carbamatos aminodiol beta-aminoacil peptidilo (Patente de los Estados Unidos No. 5,089,471); pirolimidazolonas (Patente de los Estados Unidos No. 5,075,451); péptidos que contienen estatina de flúor y de cloro o estatona (Patente de los Estados Unidos No. 5,066,643); peptidil amino dioles (Patente de los Estados Unidos Nos. 5,063,208 y 4,845,079); (Patente de los Estados Unidos No. 5.066.643); peptidilicos amino dioles (Patente de los Estados Unidos N° 5.063.208 y 4.845.079.); derivados de N-morfolino (Patente de los Estados Unidos No. 5,055,466); derivados de pepstatina (Patente de los Estados Unidos No. 4,980,283); alcoholes N-heterocíclicos (Patente de los Estados Unidos No. 4,885,292); anticuerpos monoclonales para renina (Patente de los Estados Unidos No. 4,780,401); y una variedad de otros péptidos y análogos de los mismos (Patente de los Estados Unidos Nos. 5,071,837, 5,064,965, 5,063,207, 5,036,054, 5,036,053, 5,034,512, y 4,894,437).

Los agentes que se unen a moléculas de adhesión celular e inhiben la capacidad de los leucocitos para unir a tales moléculas incluyen agentes de polipéptidos. Tales polipéptidos incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales, preparados de acuerdo con la metodología convencional. Tales anticuerpos son ya conocidos en la materia e incluyen anticuerpos anti-ICAM 1, así como otros tales anticuerpos descritos anteriormente.

Los agentes anticoagulantes incluyen, pero no se limitan a, Ancrod; solución anticoagulante de citrato dextrosa; solución anticoagulante de citrato fosfato adenina dextrosa; solución anticoagulante de dextrosa citrato fosfato; solución anticoagulante de heparina; solución anticoagulante de citrato de sodio; ardeparina de sodio; bivalirudina; bromindiona; dalteparina sódica; desirudina; dicumarol; heparina de calcio; heparina de sodio; liapolato de sodio; nafamostat mesilato; fenprocumon; tinzaparin de sodio; y warfarina sódica.

La heparina puede estabilizar los síntomas en la evolución de accidente cerebrovascular, pero los anticoagulantes son inútiles (y posiblemente peligrosos) en el accidente cerebrovascular agudo, y están contraindicados en los pacientes hipertensos debido a la mayor posibilidad de hemorragia en el cerebro u otros órganos. A pesar de que el tiempo es objeto de controversia, los anticoagulantes pueden comenzar a prevenir la embolia recurrente cardiogénica. Agentes de lisis de coágulos, incluyendo el activador de plasminógeno de tejido y estreptoquinasa, se están evaluando para el tratamiento muy temprano del accidente cerebrovascular agudo. Recientemente se ha demostrado que nimodipino mejora la supervivencia y el resultado clínico después del accidente cerebrovascular isquémico.

Aparte de la aspirina, se ha demostrado que la ticlopidina es otro agente antiplaquetario beneficioso para el tratamiento del accidente cerebrovascular. Endarterectomía puede estar indicado en pacientes con un 70 a 99 por ciento

estrechamiento de una arteria carótida interna sintomática. Sin embargo, la mayoría de las autoridades coinciden en que la endarterectomía carotídea no está indicada en pacientes con AIT que son atribuibles al sistema basilar vertebral, en pacientes con un déficit significativo de accidentes cerebrovasculares previos, o en pacientes en los que un accidente cerebrovascular está evolucionando.

5 HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A) reductasa es la enzima microsomal que cataliza la reacción limitante de la velocidad en la biosíntesis de colesterol (HMG-CoA6Mevalonato). Un inhibidor de la HMG-CoA inhibe la HMG-CoA reductasa, y como resultado inhibe la síntesis de colesterol. Un número de inhibidores de la HMG-CoA reductasa se ha utilizado para tratar sujetos con hipercolesterolemia. Más recientemente, inhibidores de la HMG-CoA reductasa han demostrado ser beneficiosos en el tratamiento de accidente cerebrovascular (Endres M, et al, Proc Natl Acad Sci EE.UU., 1998,95: 8880-5).

10 Los inhibidores de HMG-CoA reductasa incluyen, pero no se limitan a, simvastatina (Patente de los Estados Unidos No. 4,444,784); lovastatina (Patente de los Estados Unidos No. 4,231,938); pravastatina sódica (Patente de los Estados Unidos No. 4,346,227); fluvastatina (Patente de los Estados Unidos No. 4,739,073); atorvastatina (Patente de los Estados Unidos No. 5,273,995); cerivastatina, y numerosas otras descritas en la Patente de los Estados Unidos No. 5,622,985; la Patente de los Estados Unidos No. 5,135,935; la Patente de los Estados Unidos No. 5,356,896; la Patente de los Estados Unidos No. 4,920,109; la Patente de los Estados Unidos No. 5,286,895; la Patente de los Estados Unidos No. 5,262,435; la Patente de los Estados Unidos No. 5,260,332; la Patente de los Estados Unidos No. 5,317,031; la Patente de los Estados Unidos No. 5,283,256; la Patente de los Estados Unidos No. 5,256,689; la Patente de los Estados Unidos No. 5,182,298; la Patente de los Estados Unidos No. 5,369,125; la Patente de los Estados Unidos No. 5,302,604; la Patente de los Estados Unidos No. 5,166,171; la Patente de los Estados Unidos No. 5,202,327; la Patente de los Estados Unidos No. 5,276,021; la Patente de los Estados Unidos No. 5,196,440, la Patente de los Estados Unidos No. 5,091,386; la Patente de los Estados Unidos No. 5,091,378; la Patente de los Estados Unidos No. 4,904,646; la Patente de los Estados Unidos No. 5,385,932; la Patente de los Estados Unidos No. 5,250,435; la Patente de los Estados Unidos No. 5,132,312; la Patente de los Estados Unidos No. 5,130,306; la Patente de los Estados Unidos No. 5,116,870; la Patente de los Estados Unidos No. 5,112,857; la Patente de los Estados Unidos No. 5,102,911; la Patente de los Estados Unidos No. 5,098,931; la Patente de los Estados Unidos No. 5,081,136; la Patente de los Estados Unidos No. 5,025,000; la Patente de los Estados Unidos No. 5,021,453; la Patente de los Estados Unidos No. 5,017,716; la Patente de los Estados Unidos No. 5,001,144; la Patente de los Estados Unidos No. 5,001,128; la Patente de los Estados Unidos No. 4,997,837; la Patente de los Estados Unidos No. 4,996,234; la Patente de los Estados Unidos No. 4,994,494; la Patente de los Estados Unidos No. 4,992,429; la Patente de los Estados Unidos No. 4,970,231; la Patente de los Estados Unidos No. 4,968,693; la Patente de los Estados Unidos No. 4,963,538; la Patente de los Estados Unidos No. 4,957,940; la Patente de los Estados Unidos No. 4,950,675; la Patente de los Estados Unidos No. 4,946,864; la Patente de los Estados Unidos No. 4,946,860; la Patente de los Estados Unidos No. 4,940,800; la Patente de los Estados Unidos No. 4,940,727; la Patente de los Estados Unidos No. 4,939,143; la Patente de los Estados Unidos No. 4,929,620; la Patente de los Estados Unidos No. 4,923,861; la Patente de los Estados Unidos No. 4,906,657; la Patente de los Estados Unidos No. 4,906,624; y la Patente de los Estados Unidos No. 4,897,402, las divulgaciones de las cuales patentes se incorporan en este documento por referencia.

40 El óxido nítrico (NO) ha sido reconocido como una molécula mensajera con muchas funciones fisiológicas, en los sistemas cardiovascular, neurológico e inmunológico (Griffith, TM et al., J Am Coll Cardiol, 1988, 12:797-806). Este media la relajación de los vasos sanguíneos, la neurotransmisión y supresión de patógenos. El NO es producido a partir del nitrógeno guanidino de L-arginina por la NO sintasa (Moncada, S and Higgs, EA, Eur J Clin Invest, 1991, 21: 361-374). Los agentes que regulan positivamente óxido nítrico sintasa de las células endoteliales incluyen, pero no se limitan a, L-arginina, inhibidores de la función *rho* GTPasa (véase la Solicitud Internacional WO 99/47153, cuya descripción se incorpora en este documento por referencia), y los agentes que interrumpen citoesqueleto de actina organización (véase la Solicitud Internacional WO 00/03746, cuya divulgación se incorpora por el presente documento como referencia).

45 La invención se entenderá más completamente por referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos pretenden simplemente ilustrar las realizaciones de la invención y no debe interpretarse que limitan el alcance de la invención.

50 Ejemplos

Ejemplo 1.

Protocolos experimentales: Materiales y Métodos

Dispositivo de tensión mecánica

Generalmente los experimentos de cardiomiocitos de sobrecarga mecánica se han realizado estirando células sin control del ciclo cardiaco, una estrategia que no permite diferenciar entre sobrecarga mecánica en contracción frente a relajación. En el presente estudio, se diseñó y se construyó un sistema experimental exclusivo que permitía controlar con precisión tensiones mecánicas, así como la electroestimulación en cardiomiocitos cultivados, para investigar, *inter alia*, como regula el ciclo cardiaco la mecanotransducción de cardiomiocitos, e identificar genes que están implicados en dicha regulación.

El dispositivo de tensión - estimulación. La estrategia para la estimulación mecánica usó un aparato que tiene platinas múltiples que contactan con la parte inferior de membranas elastoméricas de silicona para aplicar un perfil de tensión biaxial espacialmente isotrópico en la membrana (Schaffer JL, et al., J Orthop Res, 1993,12:709-719; y Solicitud de la Patente Provisional de los Estados Unidos presentada el 16 de julio de 1999 titulada "AN APPARATUS FOR STUDYING MYOCARDIAL MECHANICAL OVERLOAD HYPERTROPHY AND USES THEREFOR, por Richard T. Lee, y con el número de expediente del mandatario 100038.130 y número de correo urgente EL110243781US). Se estiraron seis membranas individuales de 78 mm a la vez controlando con diversas amplitudes de tensión el desplazamiento de cada platina con un motor de velocidad gradual. Las tensiones Green medidas se ajustaron a $\pm 0.25\%$ a tensiones de 1-14% (Cheng GC, et al., Circ Res, 1997, 80: 28-36; Brown TD, J Biomechanics, 2000, 33: 3-14). Durante todo este estudio se usó una tensión biaxial del 8%.

Para controlar la sincronización de la tensión mecánica con respecto al ciclo cardiaco, el ordenador marcó el ritmo cada disco eléctricamente y se controló: la fase entre la tensión mecánica y el impulso eléctrico, la duración del impulso eléctrico y el voltaje del impulso. Además, los impulsos eléctricos tuvieron polaridad alterna para minimizar efectos electroquímicos tales como gradientes de pH en los electrodos. Cada una de las dos salidas se conectó a un solo conjunto de electrodos en cada disco. Los discos se controlaron en paralelo con una resistencia de aproximadamente 500 ohms por disco.

Las fuentes de voltaje positivas y negativas se proporcionaron mediante dos suministros de energía (6545A, Hewlett Packard Company, Palo Alto, CA). El circuito de control se dividió en dos partes: un circuito de alto voltaje y un circuito de señal digital o de bajo voltaje. El circuito de alto voltaje era una puerta que conmuta la salida basándose en la señal de entrada. El circuito de bajo voltaje aceptaba dos señales de control a partir del ordenador y aceptaba la anchura de impulso desde una resistencia variable, que controlaba las puertas de voltaje positivas y negativas. El circuito de bajo voltaje permitía un impulso de voltaje entre 0-120V DC de amplitud y una duración de 2-37 ms. Las luces proporcionaron supervisión continua de los impulsos y la sincronización de los circuitos y la calibración se validaron mediante osciloscopio.

Los electrodos de cada disco eran dos electrodos de alambre de AgCl_2 con forma de arco en la base de la superficie interna del disco, justo por encima de la membrana deformable. Los electrodos se prepararon de antemano, se esterilizaron con etanol y se colocaron en el disco justo antes de cada experimento para minimizar la posible toxicidad de la plata. Usando este procedimiento no se observó muerte o desprendimiento celular durante las 24 horas del experimento. Cada arco tenía 120 grados; se realizó un análisis de elemento finito bidimensional para calcular la uniformidad del campo de potencial con esta configuración. Estos cálculos calculan una variación espacial en el potencial de campo de $\{\text{raíz cuadrática media}\} = 29\%$. Por lo tanto, este sistema proporciona una tensión mecánica biaxial altamente uniforme, con una variación relativamente pequeña en el campo de voltaje.

Protocolos de estimulación mecánica. Se impuso tensión solamente durante el primer tercio de ciclo cardiaco por estimulación eléctrica de tensión impuesta durante la "fase sistólica", y solamente durante un tercio del ciclo cardiaco en la fase de relajación para la tensión impuesta durante la "fase diastólica", respectivamente. Las condiciones usadas en este estudio fueron: (1) control; (2) tensión, sin estimulación; (3) estimulación, sin tensión; (4) tensión impuesta durante fase sistólica y (5) tensión impuesta durante la fase diastólica. Se aislaron miocitos ventriculares de ratas neonatales (MVRN) de ratas Sprague-Dawley de 1 día de vida mediante procedimientos descritos anteriormente (Springhorn JP and Claycomb WC., Biochem J, 1989; 258: 73-78; Arstall MA, et al., J Mol Cell Cardiol, 1998, 30: 1019-25). Los MVRN se sembraron en placas sobre el disco de membrana revestido a una densidad de 2,000,000 células/disco en DMEM que contenía FCS al 7% y se incubó durante 24 h. La confluencia celular aproximada fue del 85-90%. Después, los MVRN se inactivaron lavando dos veces con 10 mL de solución salina equilibrada con Hanks (HBSS, NaCl 138 mM, KCl 5.3 mM, NaHCO_3 4.0 mM, CaCl_2 1.3 mM, MgCl_2 0.5 mM, MgSO_4 0.4 mM, KH_2PO_4 0.4 mM, Na_2HPO_4 0.3 mM, glucosa 5.6 mM; Life Technologies, Inc., Rockville, MD) y se incubaron con 26 mL de DMEM que contenía FCS al 0.2% durante 48-72 horas.

En estas condiciones de cultivo celular, las células latían a 40-60 latidos/minuto. A esta velocidad, se observó competencia despreciable cuando se estimulaban a un ritmo de 70 latidos/minuto. Se realizaron experimentos de captura de ensayo; se muestrearon nueve localizaciones en cada disco. La eficacia de la captura fue similar en todas las localizaciones, se produjo una captura máxima a 60 V y por encima con 10 ms de anchura de impulso. Por lo tanto, se seleccionó un voltaje de 70 V con 10 ms de duración de impulso a un ritmo de 1.2 Hz (70 latidos/minuto). En estas condiciones no se observó desprendimiento celular parcial.

Perfilado transcripcional. El experimento de micromatriz de ADN se realizó con miocitos cardiacos de ratas neonatales cultivados sobre membranas revestidas con fibronectina con medio asérico durante 48 horas. Las células se deformaron con una deformación del 8% impuesta solamente durante la sístole durante un periodo de 30 minutos y se preparó ARN después de 6 horas de condiciones posteriores sin tensión y en condiciones sin estimulación. Este punto en el tiempo se basó en estudios previos que demostraban que el gen de tenascina (control positivo para cardiomiocitos) se inducía en este periodo de tiempo. Se realizó el experimento de hibridación de micromatriz de ADN usando Affymatrix GeneChip RGU34A (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA). Los datos se analizaron usando un programa informático Affymatrix.

Análisis de Northern. Usando secuencias del GenBank, se obtuvieron clones de ADNc para genes expresados diferencialmente mediante PCR. Cada clon se secuenció a partir de ambos extremos 5' y 3' para confirmar la identidad. Los elementos positivos en la micromatriz de ADN se confirmaron por análisis de hibridación por transferencia de Northern en al menos tres experimentos independientes usando tres fuentes diferentes de MVRN. Se aisló ARN total mediante el procedimiento tiocianato de guanidina y fenol cloroformo (Chomczynski, et al., Anal. Biochem., 1987, 162:156-159). Para la transferencia de Northern, se cargaron 15 µg de ARN en un gel de agarosaformaldehído al 1.0% (2.0 mol/L), se transfirió a una membrana de nailon (Amersham Pharmacia Biotech AB, Piscataway, NJ) y se entrecruzó con UV con un Stratilinker UV (Stratagene, Inc., La Jolla, CA). Cada sonda se hibridó con solución ExpressHyb (Clontech Labs., Inc., Palo Alto, CA) a 68 °C, durante 1 hora. La membrana se lavó con 2 x SSC, solución de SDS al 0.05% durante 30 a 40 minutos y tres veces a temperatura ambiente y 0.1 x SSC, solución de SDS al 0.1% con agitación continua a 50 °C durante 40 minutos. La membrana se expuso a una película a -80 °C y se escanearon radiografías y se analizaron con el programa informático Optimas 5.0 (Optimas Co./Media Cybernetics, Silver Springs, MD). Se normalizaron unidades densitométricas con respecto a la subunidad ribosómica de 28S teñida con etidio en la membrana.

Resultados. La Figura 1 muestra la evolución (temprana, a la izquierda; tardía, a la derecha) de la inducción de la expresión de ARNm de IL1RL-1 por tensión mecánica cíclica al 8% en miocitos cardiacos neonatales en cultivo. La inducción máxima se produjo a las 3 horas y se mantuvo durante 15 horas.

La Figura 2 muestra los efectos de tensión mecánica al 8%, bloqueo por receptor de angiotensina (BRA, CP-19116, 100 nM), angiotensina II (Ang II, 50 nM), interleucina-1β (IL-1β 10 ng/mL) y éster de forbol (PMA, 200 nM) durante 3 horas sobre la inducción de la expresión de ARNm de IL1RL-1 en miocitos cardiacos de ratas neonatales cultivados. La inducción de ARNm de IL1RL-1 por tensión no se bloqueó por el bloqueo de receptor de angiotensina; adicionalmente, el tratamiento con angiotensina II no indujo la expresión de ARNm de IL1RL-1. El tratamiento con IL-1β y PMA se asoció con una inducción de la expresión de ARNm de IL1RL-1 en ausencia de tensión mecánica.

La Figura 3 muestra el efecto de tensión mecánica al 8%, peróxido de hidrógeno (H₂O₂ 100 µM) y el antioxidante, TIRON (10 mM) sobre la inducción de la expresión de ARNm de IL1RL-1. A diferencia de la expresión de ARNm del gen Tenascina-C inducido mecánicamente que se indujo por H₂O₂ en ausencia de tensión mecánica y el bloqueo por TIRON, el H₂O₂ no indujo IL1RL-1 en ausencia de tensión y bloqueó la inducción de IL1RL-1 inducida por tensión. TIRON atenuó ligeramente la expresión de ARNm de IL1RL-1 en ausencia y presencia de tensión.

La Figura 4 muestra el efecto de actinomicina D (5 µg/mL, izquierda) y ciclohexamida (10 µg/mL, derecha) sobre la inducción de ARNm de IL1RL-1 por tensión mecánica al 8%. Se aplicaron actinomicina D y ciclohexamida durante la tensión mecánica. La actinomicina D bloqueó la inducción de la expresión de ARNm de IL1RL-1 a las 2 y 4 horas lo que sugiere que la inducción de IL1RL-1 en respuesta a tensión se debe al aumento de transcripción de IL1RL-1. El inhibidor de la síntesis de proteínas, la ciclohexamina, bloqueó la inducción de la expresión de ARNm de IL1RL-1 en respuesta a la tensión lo que sugiere, que para la inducción de la expresión de ARNm de IL1RL-1, se requiere la síntesis de nuevas proteínas.

La Figura 5 muestra el efecto de tensión mecánica al 8% en solitario y en combinación con interleucina-1β (IL-1β, 10 ng/mL) y éster de forbol en ausencia de tensión (PMA, 100 ng/mL) sobre la expresión de ARNm de IL1RL-1 en miocitos cardiacos neonatales cultivados. Tanto IL-1β como la tensión mecánica en solitario indujo la expresión de ARNm de IL1RL-1 pero la inducción de IL1RL-1 por tensión mecánica en presencia de IL-1β no aumentó adicionalmente lo que sugiere que la tensión mecánica e IL-1β no actúan de una manera sinérgica o aditiva sobre la inducción de IL1RL-1. Con PMA se observó la inducción más fuerte de la expresión de ARNm de IL1RL-1. El orden jerárquico de fuerza para la inducción de la expresión de ARNm de IL1 RL-1 es PMA>tensión>IL-1β.

La Figura 6 muestra miocitos cardiacos de ratas neonatales expuestos a tensión al 8% durante 0, 1, 3, 6, 9 horas. Se aisló ARN total usando un kit RNeasy. Se separaron por tamaño cinco µg de ARN total sobre gel de agarosa-formaldehído al 1% y se transfirieron a una membrana de nailon. Después del entrecruzamiento con luz UV, la membrana se hibridó con una sonda marcada con ³²P específica para la subunidad V-ATPasa B. Después la membrana se expuso a película de rayos X durante 3 horas a -80 °C con una pantalla intensificadora.

Ejemplo 2.

Introducción:

Citocinas y lesión cardiaca. Las citocinas activadas por estrés participan en muchas formas de lesión cardiaca y afecciones patofisiológicas, siendo una de las más características el factor α de necrosis tumoral, la interleucina-1 y la interleucina-6. Estas moléculas no se expresan de manera constitutiva en el corazón normal, pero se inducen rápidamente durante isquemia y reperfusión o después de sobrecarga hemodinámica, lo que sugiere que desempeñan una función importante en la respuesta miocárdica inicial frente a estímulos de estrés, lesión o crecimiento (Mann DL, Cytokine and Growth Factor Reviews. 1996;7: 341-354; St. John Sutton MG, et al. Circulation. 2000; 101: 2981-2988). Sin embargo, las citocinas también han demostrado expresarse de manera estable en afecciones miocárdicas patológicas incluyendo enfermedad cardiaca isquémica e insuficiencia cardiaca y están asociadas con un mal pronóstico (Pulkki KJ, et al.. Annals of Medicine. 1997; 29:339-343; Kubota T, et al Proc Natl Acad Sci. 1998;95:6930-6935; Aukrust P, et al. Am J Cardiol 1999;83:376-382; MacGowan GA, et al. Am J Cardiol 1997;79:1128-1132; Roig E, et al. Am J Cardiol 1998;688-690; Tsutamoto T, et al. J Am Coll Cardiol 1998;31:391-398; Prabhu SD, et al. Circulation. 2000;101:2103-2109; Murray DR, et al.. Annu Rev Immunol. 2000;18:451-494).

La señalización de la interleucina-1 mediante el receptor de interleucina-1 es un acontecimiento precoz en la señalización de citocina inflamatoria en muchos sistemas diferentes (Trehu EG., Clin Cancer Res. 1996; 8: 1341-51). En lesión cardiaca, la interleucina-6 se produce por miocitos cardiacos secundario a estimulación con interleucina-1, factor α de necrosis tumoral o lipopolisacáridos y se ha detectado en el sistema linfático después de isquemia durante reperfusión de miocardio isquémico (Gwechenberger M, et al. Circulation 1999;99:546-551). Hace poco se ha reconocido la posible expresión de citocinas antiinflamatorias que contrarrestan de manera secundaria la enfermedad cardiaca frente a la señalización de interleucina-1. La interleucina-1 y la interleucina-10 pueden suprimir la síntesis del factor α de necrosis tumoral y potenciar liberación de receptores del factor de necrosis tumoral soluble, que son ligandos drenaje para el factor de necrosis tumoral (Joyce DA., 1994; Eur. J. Immunol. 11:2699-705). La interleucina-10 está aumentada en pacientes con insuficiencia cardiaca (Yamaoka M, et al. Jpn Circ J. 1999;63:951-956) y en pacientes con cardiomiopatía dilatada, los niveles en suero de la interleucina-10 están aumentados cuando aumentan los niveles en suero del factor α de necrosis tumoral (Ohtsuka T, et al. J Am Coll Cardiol. 2001;37:412-417).

T1/ST2 (IL1RL-1): Un nuevo receptor inducido mecánicamente. Los autores de la presente invención han identificado, en el corazón, una ruta de señalización activada por estrés, posiblemente nueva: la regulación de la inducción de un gen miembro de la familia de interleucina-1, T1/ST2. Se sabe muy poco de la inducción, señalización y función de T1/ST2 en cualquier tipo de célula y T1/ST2 ha mostrado en diferentes áreas de investigación tener dos funciones aparentemente no relacionadas. Una de estas es la regulación del crecimiento y la otra es la modulación inmunitaria. Tanto el crecimiento hipertrófico compensatorio como la modulación inmunitaria/inflamatoria están implicados en la patofisiología de enfermedades cardiovasculares.

Crecimiento. El gen T1/ST2 se identificó en primer lugar por su inducción después de estimulación serológica de fibroblastos 3T3 de ratón inactivos, lo que sugiere que el gen T1/ST2 participa en la regulación del crecimiento (Tominaga S., FEBS Letters 1989; 258: 301-304). El mismo grupo identificó más tarde un transcrito más grande que consistía en dominios transmembrana y citoplásmicos homólogos con respecto al receptor de interleucina-1 de longitud completa (Yanagisawa K, et al. FEBS Letters. 1993;318:83-87).

Inmunidad. T1/ST2 se expresa en linfocitos T2 auxiliares pero no en linfocitos T1 auxiliares, del sistema inmune adaptativo, que produce interleucina-4, interleucina-5 e interleucina-10 (Yanagisawa KI, et al. J Biochem. 1997;121:95-103; Coyle AJ, et al. J Exp Med. 1999;190:895-902). Los linfocitos T2 auxiliares median respuestas beneficiosas contra infección, pero son nocivos en el desarrollo de alergia y asma. Existe una fuerte correlación entre la expresión de T1/ST2 y la producción de interleucina-4 en linfocitos T2 auxiliares (Coyle AJ, et al. J Exp Med. 1999;190:895-902). T1/ST2 desempeña una función crítica para la diferenciación y activación de linfocitos T2 auxiliares, pero no de linfocitos T1 auxiliares (O'Neill LAJ, et al. Immunology Today. 2000;21:206-209).

La inhibición de la señalización de T1/ST2 atenúa la inducción, mediada por linfocitos T2 auxiliares, de respuestas inflamatorias eosinófilas en pulmón e inhibe la secreción de citocinas de linfocitos T2 auxiliares sin modificar la secreción del interferón-gamma de linfocitos T1 auxiliares (Coyle AJ, et al. J Exp Med. 1999;190:895-902). Estos estudios indican que la expresión de T1/ST2 puede modificar el perfil de citocinas a favor de la expresión de interleucina-4, interleucina-5, interleucina-10. Hace poco se ha demostrado que la interleucina-10 tiene efectos antiinflamatorios en el entorno de lesión cardiaca (Ohtsuka T, et al. J Am Coll Cardiol, 2001;37:412-417). De manera similar, la ausencia de expresión de T1/ST2 podría dar como resultado un cambio hacia la expresión de interferón gamma, que puede ser nocivo después de lesión miocárdica.

Considerados en su conjunto, la implicación de T1/ST2 en respuestas al crecimiento y en la función inmune junto con el reconocimiento clínico de la función de las citocinas en la respuesta inflamatoria frente a isquemia/reperfusión sugieren que la activación de T1/ST2 es una ruta de señalización activada por crecimiento o estrés que contribuye al crecimiento y remodelación del miocardio.

Fenotipo de ratones carentes de T1/ST2. (Townsend MJ, et al. J Exp Med. 2000;191:1069-1075). La ausencia de T1/ST2 en ratones carentes de T1/ST2 no compromete su función inmunitaria inicial en ausencia de exposición inmune. Sin embargo, ratones carentes de T1/ST2 tienen una habilidad deteriorada para generar IL-4, IL-5 e IL-10, pero no IFN- γ (una citocina Th1) y para generar una respuesta inflamatoria de linfocitos T2 auxiliares durante la infiltración eosinófila en el pulmón (una respuesta Th2).

Los autores de la presente invención comenzaron estudiar la inducción de T1/ST2 en miocitos cardiacos y su implicación en la señalización de supervivencia/muerte en el contexto de las rutas de señalización de miocitos. Estudios preliminares presentados más adelante demuestran que, en miocitos cardiacos, T1/ST2 se induce en respuesta a interleucina-1 y a tensión mecánica y que la inducción de T1/ST2 por interleucina-1 puede ser dependiente de la activación de NF- κ B. El ARNm de T1/ST2 también se induce en células del músculo liso vascular adulto humano en respuesta a la interleucina 1. La proteína T1/ST2 se expresa en el corazón de ratón precozmente después de isquemia de miocardio *in vivo*, así como en el tejido aórtico humano de pacientes con placa inestable.

Resultados:

Estudios *in vitro*. Los siguientes estudios demuestran la inducción de T1/ST2 por tensión mecánica e interleucina-1, posiblemente a través de la activación de NF- κ B. Los dos transcritos de T1/ST2 (es decir, IL1RL-1S-soluble- e IL1RL-1M-membrana-) se inducen por tensión en miocitos cardiacos, aunque el transcrito más abundante era la isoforma soluble. El ARNm de T1/ST2 se induce por tensión mecánica en miocitos cardiacos neonatales cultivados (Figura 8).

El ARNm de T1/ST2 se induce por tensión mecánica en miocitos cardiacos neonatales cultivados. Se aislaron miocitos ventriculares de ratas neonatales por digestión con colagenasa, se sembraron en placas sobre discos de membrana de silicona revestidos con fibronectina a una densidad de 3.5 millones de células/disco en 13 mL de medio como se ha descrito anteriormente (Yamamoto K, et al. J Biol Chem. 1999;274:21840-21846). Esta técnica produce cultivos con \geq 95% de miocitos. Se aplicó deformación mecánica usando un dispositivo que proporciona tensión clínica biaxial uniforme como se ha descrito anteriormente (Yamamoto K, et al. J Biol Chem. 1999;274:21840-21846). Se extrajo ARN (Qiagen) y se realizó transferencia de Northern usando, como una sonda, un fragmento de PCR de 600 pb marcado con 32 P específico para T1/ST2 de rata. La inducción máxima se produjo a las 3 horas, se mantuvo durante 9 horas y disminuyó a las 15 horas.

Cada una de interleucina-1 β y tensión mecánica inducen ARN de T1/ST2 en miocitos cardiacos (Figura 9). Se muestra la inducción de T1/ST2 por interleucina-1 y tensión. También se descubrió que la inducción de T1/ST2 por tensión mecánica en presencia de interleucina-1 β no aumentó adicionalmente lo que sugiere que la interleucina-1 no sensibiliza miocitos frente a los efectos de tensión mecánica (o viceversa) sobre la inducción de T1/ST2. Se incluyó el punto de tiempo de 1 hora en el suceso de manera que la inducción por tensión se saturaba a las 3 horas y por lo tanto enmascaraba un efecto aditivo de la interleucina-1 β . En los dos carriles de la derecha se muestra el efecto del éster de forbol (PMA) a 1 y 3 horas. La fuerza en orden jerárquico para la inducción de la expresión de ARNm de T1/ST2 es PMA>tensión>interleucina-1 β . Dado que la interleucina-1 β señala a través de NF- κ B y PMA a través de PKC estos resultados sugieren que tanto la activación de NF- κ B como de PKC participan en la inducción de T1/ST2.

T1/ST2 puede ser un gen diana de NF- κ B en miocitos cardiacos a través de la señalización del receptor interleucina-1/interleucina-1 (Figura 10). Anteriormente indicado por los autores de la presente invención (Yamamoto K, et al. J Biol Chem. 1999;274:21840-21846), la tensión mecánica de miocitos cardiacos activa NF- κ B. Para investigar la función de NF- κ B en la inducción de interleucina-1 β y tensión del ARN de T1/ST2, se sobreexpresó I κ Ba, que disminuye la actividad de unión de ADN a NF- κ B. Se infectaron miocitos cardiacos cultivados con vector de adenovirus de sobreexpresión I κ Ba o con vector control β -galactosidasa y se expusieron durante 4 horas a tensión mecánica cíclica al 8% o interleucina-1 (10 ng/mL). Se analizó el ARN por transferencia de Northern con una sonda de ADNc de IL1RL-1 marcada con 32 P. La expresión ectópica de I κ Ba bloqueó la inducción del ARNm de T1/ST2-1 por interleucina-1 β y la tensión bloqueó parcialmente la inducción de la expresión de ARNm de T1/ST2 cuando se comparó con la inducción de T1/ST2 en células tratadas con el vector de control β -galactosidasa. Estos resultados sugieren que T1/ST2 es un gen precoz, diana de NF- κ B a través de la señalización del receptor interleucina-1/interleucina-1. Por otro lado, además de la activación de NF- κ B las rutas pueden estar implicadas en la inducción de ARN de T1/ST2 por tensión mecánica. El ARNm de T1/ST2 también se induce por interleucina-1 pero no por PMA ni factor de necrosis tumoral (FNT) en células del músculo liso vascular adulto humano.

Además de los resultados indicados anteriormente, los autores de la presente invención han observado que T1/ST2 se induce de manera secundaria en relación con la activación de NF- κ B por interleucina-1 y que NF- κ B está asociado a supervivencia de miocitos cardiacos. Además, se realizaron estudios *in vitro* para confirmar que la activación de T1/ST2 está asociada con el crecimiento y la supervivencia celular.

Estudios *in vivo*.

Materiales y métodos

Infarto de miocardio experimental en ratones. The Harvard Medical School Standing Committee on Animals, autorizó realizar procedimientos experimentales en ratones. Se creó un infarto de miocardio experimental en ratones por ligamiento de arteria coronaria como se ha descrito anteriormente (13). Se recogieron corazones de ratones 1 y 3 días después del ligamiento de arteria coronaria seguido por fijación por perfusión del corazón con Z-Fix (Anatech LTD). Después los corazones se fijaron por inmersión en Z-Fix durante una noche a 4 °C. Después de la deshidratación en soluciones de etanol en gradiente, los corazones se colocaron en Histo-Clear (National Diagnostics) y se incluyeron en parafina. Se desparafinaron cortes tisulares de micrómetros, se rehidrataron, se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3%, se aclararon en agua seguido por solución salina estandarizada con fosfato. Los cortes se bloquearon, se incubaron en 1:50 de anticuerpo primario anti- ST2 de ratón (Morwell Diagnostics) y 1:100 de anticuerpo secundario anti-rata conjugado con HRP (Vector Laboratories). Los portaobjetos se sometieron a tinción de contraste con hematoxilina y eosina.

Los estudios de pacientes y ELISA para ST2.

Estudio *HEART*. El estudio de terapia curativa y reductora de sobrecarga precoz (*HEART*, por sus siglas en inglés) era un ensayo controlado con placebo, aleatorio, de doble ocultación, en el que participaron 352 pacientes con infarto de miocardio (IM) agudo procedentes de 36 centros en los Estados Unidos y Canadá. Se admitieron hombres y mujeres, mayores de 21 años, que habían sufrido un IM en 24 horas. Previamente se describieron los criterios de inclusión y exclusión y los detalles del ensayo diseñado Pfeffer M.A., et al., *Circulation*, 1997, 95:2643-2651; Greaves S.C., et al., *Am. J. Cardiol*, 1997, 80:442-448; Solomon S.D., et al., *Ann. Intern. Med.*, 2001, 134:451-458; Aikawa Y., et al., *Am. Heart J*, 2001, 141:234-242). Para este estudio, se disponía de muestras de sangre en serie de los días 1, 14 y 90 después de infarto de miocardio de 69 pacientes seleccionados al azar en el ensayo *HEART*. Se ensayó T1/ST2 soluble con un ensayo ELISA de tipo sándwich monoclonal doble que se ha descrito previamente (Kuroiwa K., et al., *Hybridoma*, 2000, 19:151-159). El ensayo se encuentra disponible en el mercado (MBL International, Watertown, MA).

Estudio *PRAISE*. El estudio del ensayo prospectivo aleatorio de supervivencia con Amlodipino (*PRAISE*, por sus siglas en inglés) era un estudio prospectivo a gran escala de amlodipino en pacientes con insuficiencia cardíaca debido a enfermedad arterial coronaria. Los resultados de este ensayo fueron nulos para el aprovechamiento de la amlodipino en insuficiencia cardíaca aguda. Se extrajeron muestras de sangre al inicio de este estudio antes de la terapia y después dos veces más durante el estudio. Se ensayó la T1/ST2 soluble, como se ha descrito anteriormente. Uno de los ensayos de sangre normales clave para detectar insuficiencia cardíaca es el péptido natriurético cerebral (PNC). Se examinó si los niveles de T1/ST2 en pacientes con insuficiencia cardíaca estaban modificados y si en estos pacientes niveles de T1/ST2 se correlacionaban con niveles del PNC.

Estadísticas. Cada experimento *in vitro* mostrado se realizó un mínimo de tres veces. Los valores son medias \pm ETM. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía o mediante ANOVA para medidas repetidas, con análisis de comparaciones múltiples de Bonferroni de correlación coincidente (*post hoc*) cuando fuera apropiado. Se realizó regresión lineal sobre valores en suero con valores logarítmicos transformados debido a distribuciones paramétricas no normales. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $P < 0.05$.

Resultados:

Expresión *in vivo* de la proteína T1/ST2 en infarto de miocardio en ratones. Para evaluar la expresión de T1/ST2 en miocardio lesionado, se sometieron ratones a infarto de miocardio experimental a través de ligamiento de la arteria coronaria. La Figura 11 muestra la expresión de la proteína T1/ST2 usando inmunohistoquímica en corazones de ratón 1 y 3 días después de infarto de miocardio. Un día después del infarto de miocardio (post-IM), se observó tinción positiva en todas las regiones de las zonas del ventrículo izquierdo, normales, infartadas y frontera, pero no 3 días después del infarto de miocardio. En los controles intervenidos simulados no se observó tinción para T1/ST2 los días 1 y 3. Estos resultados sugieren que la proteína T1/ST2 se expresa en respuesta a lesión aguda durante la fase precoz de post-infarto observándose restauración antes de la migración de macrófagos hacia el interior de las zonas infartadas y frontera vistas a los 3 días. El anticuerpo monoclonal usado para estos estudios no diferenció entre las formas soluble y de membrana de T1/ST2.

La T1/ST2 soluble aumenta en la circulación sistémica de pacientes un día después del infarto de miocardio.

Dado que la T1/ST2 soluble está muy inducida en miocitos cardiacos y la proteína T1/ST2 está muy expresada en miocardio de ratón después de infarto de miocardio experimental, se realizó la hipótesis de que la T1/ST2 soluble aumentaba en la circulación sistémica de pacientes después de infarto de miocardio.

Procedimientos y Resultados: Usando un ensayo ELISA de tipo sándwich monoclonal doble, los autores de la presente invención ensayaron muestras de sangre de los 69 participantes del estudio *HEART* el día del infarto de miocardio (día

1), así como los días 14 y 90 después del infarto. Como se muestra en la Figura 12a, la proteína T1/ST2 sistémica se aumentó significativamente un día después del infarto de miocardio (media ± ETM, 3.8 ± 0.4 ng/mL, p<0,001; intervalo, 0.32 a 17.42 ng/mL) en comparación con el día 14 (media ± ETM, 0.98 ± 0.06 ng/mL; intervalo, 0.25 a 3.42 ng/mL) y con el día 90 (media ± ETM, 0.79 ± 0.07 ng/mL; intervalo, 0.02 a 3.53 ng/mL; día 14 frente a día 90, P=NS). Los valores medios el día 90 fueron similares a los valores medios publicados para controles sanos (Kuroiwa K., et al., Hybridoma, 2000, 19:151-159). Los niveles de la proteína T1/ST2 sistémica se correlacionan positivamente con niveles de creatina quinasa máximos (r=0.41, p<0.001), como se muestra en la Figura 12b. Niveles elevados de la proteína ST2 sistémica se asociaron también con una fracción de expulsión baja un día después del infarto de miocardio como se muestra en el análisis cuartil (p=0.03) en la Figura 12c.

10 Conclusiones: Estos resultados sugieren una regulación coordinada entre el grado de lesión miocárdica y la síntesis y secreción de T1/ST2 soluble en la circulación sistémica en el entorno clínico de infarto de miocardio.

La T1/ST2 soluble aumenta en la circulación sistémica de pacientes con insuficiencia cardiaca crónica aguda.

15 Este estudio ensayó la hipótesis de que en el suero de pacientes con insuficiencia cardiaca crónica grave, los niveles de T1/ST2 soluble están asociados con los niveles de PNC, PNPro-A y norepinefrina, neurohormonas que están aumentadas en insuficiencia cardiaca.

20 Procedimientos y Resultados: Se usaron muestras de suero, variables clínicas y niveles de neurohormonas procedentes del subestudio neurohormonal del estudio 2 prospectivo aleatorio de supervivencia con amlodipino para insuficiencia cardiaca (PRAISE-2) (New York Heart Association functional class III or IV, end point: mortality or transplantation). El estudio PRAISE-2 era un estudio controlado por placebo, grupal paralelo, con doble ocultación, al azar, multicentro, para evaluar el efecto de 10 mg/día de amlodipina sobre la supervivencia en pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva de etiología no isquémica. El ensayo consistió en la incorporación de pacientes procedentes de 240 lugares de los Estados Unidos y Canadá. El subestudio neurohormonal consistió en la incorporación de 181 pacientes procedentes de 26 centros que participaban en el estudio principal. Tanto el PRAISE-2 principal como el subestudio neurohormonal fueron aprobados por el comité institucional de análisis de las instituciones participantes. Se admitieron pacientes que tenían al menos 18 años de edad, que habían padecido insuficiencia cardiaca de etiología no isquémica, con síntomas en reposo o después de ejercicio mínimo (New York Heart Association functional class III or IV) y una fracción de expulsión ventricular izquierda inferior al 30%. Todos los pacientes se trataron con inhibidores ACE y digoxina durante al menos 3 meses. Se excluyeron pacientes que habían tenido un historial reciente o antiguo de angina de pecho.

30 Ensayos para T1/ST2, neurohormonas y medición de estrés oxidativo. Se evaluaron muestras de sangre al inicio y a las 2 semanas (Tabla 1). La T1/ST2 soluble se midió con un procedimiento ELISA de anticuerpo monoclonal de tipo sándwich doble (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd., Nagoya, Japón) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Resumiendo, se incubaron muestras de suero o patrones en los micropocillos revestidos con anticuerpos anti T1/ST2 humanos. Después de lavar, en los micropocillos se añadió anticuerpo anti- humano T1/ST2 conjugado con peroxidasa y se incubaron. Después de otro lavado, se añadió sustrato de peroxidasa y se determinó la densidad óptica a 450 nm. Se midieron las catecolaminas en circulación (norepinefrina, epinefrina, dopamina), la angiotensina II, los péptidos natriuréticos (péptido natriurético pro-atrial (PNPro-A), péptido natriurético cerebral (PNC)) y los índices de estrés oxidativo (malondialdehído, adrenolutina) como se ha descrito anteriormente (Dhalla KS, et al., Mol Cell Biochem, 1989;87:85-92; Moe GW, et al., Am Heart J, 2000;139:587-95). Se realizaron mediciones de suero de T1/ST2 sobre muestras procedentes de 162 pacientes obtenidas en la incorporación del ensayo y de 135 de los mismos pacientes obtenidas 2 semanas después de la incorporación del ensayo. Los niveles iniciales de T1/ST2 se correlacionaron con niveles de PNC iniciales (r=0,3511, p<0,0001), niveles de PNProA iniciales (r=0.3598, p<0.0001) y niveles de norepinefrina iniciales (r = 0.3854, p<0.0001) (Tabla 2). El cambio en T1/ST2 (niveles de T1/ST2 a las 2 semanas menos los niveles de T1/ST2 en la incorporación del ensayo) fue significativo como una predicción univariante de mortalidad o trasplante (p=0.048) como el del PNC inicial (p<0.0001) y el PNPro-A inicial (p<0.0001) (Tabla 3). En modelos multivariantes que incluyen PNC y PNProA, el cambio en T1/ST2 permaneció significativo como una predicción independiente de mortalidad o trasplante independiente del PNC y del PNPro-A (Tabla 4).

Tabla 1. Características iniciales

A. Todos los pacientes				
	N	Mediana	5° Percentil	95° Percentil
ST2 inicial (ng/mL)	161	0.24	0.16	0.70
BNP inicial (pmol/L)	162	56.0	3.70	264.30

ES 2 573 471 T3

PNProA inicial (pg/L)	162	1778.50	531.00	5615.00
Norepinefrina (pg/mL)	158	401.58	165.90	1096.00
Dopamina (pg/mL)	158	39.06	4.22	398.40
Epinefrina (pg/mL)	158	54.92	11.64	139.90
Angiotensina II (pg/mL)	157	22.60	7.00	67.30
Adrenolutina (ng/mL)	156	22.84	4.31	369.31
Creatinina (mmol/L)	158	1.10	0.80	1.90
Edad (años)	157	59.9	32.5	78.2
Índice de Masa Corporal (kg/mm2)	157	27.6	20.4	39.7
Fracción de expulsión LV	158	22.0	11.0	30.0

B. Pacientes Con Muestras de Sangre al inicio y a la Semana 2

	N	Mediana	5° Percentil	95° Percentil
ST2 inicial (ng/mL)	135	0.24	0.15	0.81
PNC inicial (pmol/L)	135	54.90	3.30	264.30
PNProA inicial (pg/L)	135	1788.00	488.00	4788.00
Norepinefrina (pg/mL)	130	395.05	171.70	1118.00
Dopamina (pg/mL)	130	64.02	4.32	405.50
Epinefrina (pg/mL)	130	56.07	12.24	134.80
Angiotensina II (pg/mL)	131	21.70	7.00	58.30
Adrenolutina (ng/mL)	130	24.41	4.43	369.31
Creatinina (mmol/L)	135	1.10	0.80	2.00
Edad (años)	134	60.5	34.4	78.2
Índice de Masa Corporal (kg/mm2)	134	27.4	20.5	39.7
Fracción de expulsión LV	135	22.0	11.0	30.0

Tabla 2. Relación de ST2 frente a Variables Clínicas y Neurohormonas: Correlaciones de Spearman

		ST2 inicial	Cambio en ST2
PNC inicial (pmol/L)	R	0.3511	-0.11327
	valor p	<0.0001	0.1843
	N	161	139

ES 2 573 471 T3

PNProA inicial (pmol/L)	R	0.35979	-0.10967
	<i>valor p</i>	<0.0001	0.1987
	N	161	139
Cambio en PNC* (pmol/L)	R	-0.10184	0.21497
	<i>valor p</i>	0.2329	0.0110
	N	139	139
Cambio en PNProA* (pmol/L)	R	0.05584	0.28847
	<i>valor p</i>	0.5138	0.0006
	N	139	139
Norepinefrina (pg/mL)	R	0.38535	-0.25253
	<i>valor p</i>	<0.0001	0.0032
	N	156	134
Dopamina (pg/mL)	R	0.07879	0.22127
	<i>valor p</i>	0.3283	0.0102
	N	156	134
Epinefrina (pg/mL)	R	0.08043	-0.12110
	<i>valor p</i>	0.3182	0.1634
	N	156	134
Angiotensina II (pg/mL)	R	0.00374	-0.00725
	<i>valor p</i>	0.9630	0.9335
	N	156	135
Adrenolutina (ng/mL)	R	0.00544	-0.10422
	<i>valor p</i>	0.9464	0.2308
	N	155	134
Creatinina (unidades)	R	0.16567	0.02513
	<i>valor p</i>	0.0388	0.7724
	N	156	135
Fracción de Expulsión LV	R	-0.08006	0.03651
	<i>valor p</i>	0.3205	0.6742
	N	156	135
Edad (años)	R	-0.11768	0.19260

	<i>valor p</i>	0.1447	0.0274
	N	155	134
Índice de Masa Corporal (unidades)	R	0.04561	-0.05410
	<i>valor p</i>	0.5731	0.5347
	N	155	134

R, coeficiente de correlación de Spearman; N, número de muestra. Los valores iniciales, son los valores en la incorporación del ensayo; * Cambio, valores a las 2 semanas menos los valores en la incorporación del ensayo

Tabla 3. Predicciones Univariantes de Mortalidad y Transplante (Criterio de Valoración)

Variable	Razón de Probabilidades	Intervalo de confianza del 95%	Valor de p
ST2 iniciales, por 0.1 ng/mL	1.114	0.961-1.300	0.1509
BNP iniciales, por 10 pmol/L	1.106	1.060-1.161	<0.0001
ProANP iniciales, por 10 pg/L	1.007	1.005-1.010	<0.0001
Cambio en ST2*, por cambio de 0.1 ng/mL	1.320	1.042-1.827	0.0482
Cambio en PNC*, por cambio de 10 pmol/L	1.033	0.966-1.110	0.3401
Cambio en PNProA*, por cambio de 10 pg/L	1.003	0.997-1.009	0.3413
Norepinefrina, por 1 pg/mL	1.001	1.000-1.002	0.0562
Dopamina, por 10 pg/mL	1.029	1.006-1.059	0.0433
Epinefrina, por 1 pg/mL	0.999	0.995-1.001	0.6645
Angiotensina II, por 1 pg/mL	0.997	0.977-1.017	0.7921
Adrenolutina, por 10 ng/mL	0.985	0.943-1.017	0.4167
Creatinina, por 1 mmol/L	2.487	0.997-6.417	0.0526
Fracción de Expulsión LV	0.952	0.897-1.007	0.0906
Raza	1.947	0.946-4.192	0.0776
Género	1.225	0.576-2.728	0.6061
Edad	1.435	1.099-1.914	0.0104
Etiología	1.543	0.744-3.336	0.2543
Índice de Masa Corporal, por 1 kg/mm2	0.972	0.919-1.021	0.2876

Valores iniciales, en la incorporación del ensayo; * Cambio, valores a las 2 semanas menos los valores en la incorporación del ensayo.

Tabla 4. Predicciones Multivariantes de Mortalidad y Transplante (Criterio de valoración): Valor Predictivo de ST2

Variables	<i>p</i>
ST2 inicial y PNC inicial	
PNC inicial	0.0003
Dopamina inicial	0.0906
ST2 inicial	0.6368
<hr/>	
ST2 inicial y PNProA inicial	
PNProA inicial	<0.0001
Dopamina inicial	0.0944
ST2 inicial	0.3306
<hr/>	
Cambio en ST2* y PNC inicial	
PNC inicial	0.0001
Cambio en ST2	0.0392
<hr/>	
Cambio en ST2* y PNProA inicial	
PNProA inicial	<0.0001
Cambio en ST2	0.0274

Valores iniciales, en la incorporación del ensayo; * Cambio, valores a las 2 semanas menos los valores en la incorporación del ensayo.

Ejemplo 3

Procedimientos

- 5 Poblaciones del estudio. El ensayo de Trombólisis en Infarto de Miocardio (TIMI) 14 era un estudio al azar, abierto, con variación de dosis, de terapia de reperfusión por combinación para pacientes con IM por elevación del segmento ST realizado entre marzo de 1997 y julio de 1998. Específicamente, este estudio era un ensayo angiográfico que comparaba 4 combinaciones trombolíticas diferentes: abciximab en solitario, alteplasa en solitario, abciximab con dosis reducida de alteplasa y abciximab con dosis reducida de estreptoquinasa (Antman EM et al., *Circulation*, 1999; 99:2720-32; Antman EM et al., *Eur Heart J*, 2000; 21:1944-53). El ensayo ENTIRE-TIMI 23 era un estudio multicentro, con variación de dosis, abierto, realizado entre febrero del 2000 y septiembre del 2001 para evaluar la enoxaparina como terapia antitrombina complementaria con diversas formas de reperfusión farmacológica, incluyendo tenecteplasa de dosis completa y tenecteplasa de mitad de dosis más abciximab (Antman EM et al., *Circulation*. 2002;105:1642-9). En ambos estudios, los pacientes se admitían para su inclusión si presentaban un episodio calificativo de molestia isquémica durante al menos 30 minutos a las 6 horas (ENTIRE) o a las 12 horas (TIMI 14) y presentaban al menos una elevación del segmento ST de 0.1 mV en 2 derivaciones electrocardiográficas precordiales contiguas. Los criterios de exclusión para ambos ensayos incluyeron riesgo aumentado de hemorragia, insuficiencia renal grave y choque cardiogénico.

- 20 Análisis de laboratorio. Se evaluaron muestras de suero recogidas al inicio, y después de 1, 3, 12 y 24 horas de la incorporación en TIMI 14. Solo se disponía de las muestras de suero iniciales del ensayo ENTIRE. El suero se aisló a los 60 minutos de la recogida de las muestras y se conservó a -20 °C o a menor temperatura hasta su transporte al TIMI Biomarker Core Lab (Boston, MA), donde las muestras se conservaban a -70 °C. La ST2 soluble se midió con un procedimiento ELISA de anticuerpo monoclonal doble de tipo sándwich (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd., Nagoya, Japón). Las muestras de suero o patrones se incubaron en micropocillos revestidos con anticuerpo anti ST2 humano. Después de lavar, se añadió a los micropocillos anticuerpo anti-ST2 humano conjugado con peroxidasa y se incubaron. Después de lavar de nuevo, se añadió el sustrato de peroxidasa y se determinó la densidad óptica a 450 nm. Se midieron la proteína reactiva C de alta sensibilidad (PRC-as, Dade-Behring Inc, Deerfield, IL), la isoenzima creatina quinasa MB (CK-MB), el péptido natriurético de tipo cerebral (SHIONORIA BNP, Shionogi, Osaka, Japón) y la troponina cardíaca I (ACS:180, Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY) usando procedimientos descritos anteriormente
- 30 (Morrow DA et al., *J Am Coll Cardiol*. 1998;31:1460-5; Morrow DA et al., *Clin Chain*. 2000;46:453-460). Los niveles de la isoenzima creatina quinasa se midieron localmente en el sitio de admisión, a las 3 horas, y a intervalos de 6 a 8 horas

durante las primeras 24 horas. Debido a la disponibilidad de las muestras, los niveles del PNC se midieron en las muestras de ENTIRE-TIMI 23, pero no en las de TIMI 14.

5 Análisis estadísticos. Los pacientes se dividieron en cuartiles basándose en sus niveles en suero de ST2 en el momento de la incorporación en los estudios. Los niveles de ST2 se describen usando la mediana y percentiles 25°- 75°. La asociación entre las características clínicas iniciales y los cuarteles de ST2 se analizaron usando el ensayo de Kruskal-Wallis para variables continuas y el ensayo de la X² para variables categóricas. Las correlaciones entre ST2 y otras variables iniciales continuas se estudiaron con un coeficiente de correlación (de Spearman) no paramétrico. Para la evaluación de asociación con resultados clínicos, se comparó la ST2 entre pacientes que cumplían un criterio de valoración de estudio y los que no usaban el ensayo de Wilcoxon de la suma de rangos. El análisis multivariable de la asociación de ST2 con los resultados se realizó usando regresión logística incluyendo términos para predicciones establecidas de mortalidad en infarto de miocardio por elevación de ST (IMEST) (Morrow, DA et al., Circulation 2000; Oct 24; 102(17):2031-7). Excepto cuando se indique, los resultados presentados son para la población del estudio TIMI 14 y ENTIRE-TIMI 23 combinado.

Resultados

15 ST2 inicial y variables clínicas. La mayoría de las características clínicas iniciales, incluyendo género, edad, peso y grado de enfermedad arterial coronaria no se correlacionaron con niveles de ST2 iniciales (Tabla 5). Pocos pacientes en esta población presentaron un historial previo o pruebas clínicas de insuficiencia cardiaca. De manera interesante, la frecuencia cardiaca se correlacionó positivamente con niveles de ST2 (p<0.0001) y la presión sanguínea sistólica mostró una correlación leve con niveles de ST2 (p = 0.05), de acuerdo con la teoría de que ST2 se secreta por miocitos cardiacos bajo estrés biomecánico. Los biomarcadores, la troponina cardiaca I, el PNC y la PRC, que habían mostrado predecir resultados después de infarto de miocardio (de Lemos JA et al., N Engl J Med 2001; 345:1014-21; Antman EM et al, N Engl J Med 1996; 335:1342-9; Morrow DA et al., J Am Coll Cardiol 1998;31:1460-5) se correlacionaron con ST2 por análisis cuartil y la troponina cardiaca I y la PRC fueron estadísticamente significativas. Cuando estos biomarcadores se evaluaron como variables continuas, se observaron correlaciones cuantitativamente ligeras (Tabla 6).

25 Tabla 5. Características Clínicas Iniciales de Acuerdo con Cuartiles de ST2 (ng/mL)

	Cuartil 1	Cuartil 2	Cuartil 3	Cuartil 4	tendencia de p	p del C4 frente al C1
Intervalo, ng/mL	0.085-0.179	0.180-0.235	0.236-0.346	0.347-6.88		
n	204	202	202	202		
Duración de DT para aleatorización (horas)	2.8 ± 1.6	3.1 ± 1.5	3.2 ± 1.4	4.0 ± 1.9	<0,0001	<0.0001
Edad (años)	58 ± 10	58 ± 10	58 ± 11	58 ± 10	0.9	1.0
Hombres	74%	77%	85%	81%	0.03	0.09
Blanco	88%	89%	90%	88%	0.9	1.0
Historial Médico Anterior						
Hipertensión	25%	24%	36%	33%	0.02	0.09
Insuficiencia Cardiaca Congestiva	0%	0%	1.5%	1.0%	0.1	0.2
Angina	26%	24%	26%	32%	0.3	0.2
Diabetes	14%	14%	15%	16%	0.9	0.5
Historial Familiar de EAC	73%	73%	73%	73%	0.2	0.08
Hipercolesterolemia	22%	21%	21%	29%	0.2	0.1
Hábito de fumar:						

Fumador actual	57%	48%	49%	48%	0.2	0.06
Hallazgos físicos						
Peso en kg	83 ± 16	81 ± 15	82 ± 14	83 ± 15	0.4	0.8
PS sistólica (mm Hg)	139 ± 21	138 ± 22	141 ± 23	143 ± 22	0.1	0.05
FC (PNC)	71 ± 17	75 ± 17	72 ± 16	80 ± 17	0.001	<0.0001
Clase Killip II-IV	2.0%	1.5 %	3.6%	4.5%	0.3	0.2
Ensayo de Diagnóstico						
cTnI >0.1 ng/mL*	61%	69%	77%	84%	0.001	<0,0001
PNC > 80 pg/mL*	1.8%	5.4%	7.2%	14.4%	0.003	0.001
CRP > 1.5 ng/mL	2.1%	8.8%	8.1%	11.4%	0.006	<0.0001
Creatinina mg/dl	1.0 ± 0.21	1.0 ± 0.20	1.0 ± 0.25	1.1 ± 0.28	± 0.1	0.03
Grado de EAC (estenosis al 50%)					0.3	0.2
1 vaso	48%	55%	45%	50%		
2 vasos	38%	28%	34%	30%		
3 vasos	15%	18%	20%	20%		
EF (%)**	58 ± 15	58 ± 15	57 ± 15	57 ± 15	1.0	0.9

DT = Dolor Torácico; FC = Frecuencia Cardíaca; cTnI = Troponina Cardíaca I; BNC = Péptido Natriurético tipo B; PRC = Proteína Reactiva C; EAC = Enfermedad Arterial Coronaria; FE = Fracción de Expulsión

*Medida sólo en la población ENTIRE-TIMI 23; N=448 excepto **(N = 469)

Tabla 6. Correlación entre ST2 y Variables Continuas

Variable	rho de Spearman	Valor de P
Duración de DT para aleatorización	0.29	<0.0001
Edad	-0.003	0.9
Peso (kg)	0.01	0.8
Pico CKMB	0.08	0.02
cTnI*	0.26	<0.0001
PRC	0.10	0.007
PNC*	0.068	0.15
Creatinina	0.09	0.01
FELV**	-0.005	0.9

DT = Dolor Torácico; CKMB = isoenzima de creatina quinasa MB; cTnI = Troponina Cardíaca I; PNC = Péptido Natriurético tipo B; PRC = Proteína Reactiva C; EAC = Enfermedad Arterial Coronaria; FE = Fracción de Expulsión

*Medida sólo en la población ENTIRE-TIMI 23; N=448 excepto **(N=469)

ST2 y resultados clínicos. Para la cohorte combinada de 810 pacientes, la ST2 inicial se asoció significativamente con resultados clínicos a los días (Tabla 7). Específicamente, los niveles de ST2 se mostraron significativamente más altos entre pacientes que posteriormente fallecieron ($p = 0.0001$) o desarrollaron una nueva enfermedad de ICC o empeoramiento de ICC ($p = 0,009$) 30 días después de la incorporación en el estudio. Los elevados niveles iniciales de ST2 dicotomizados con respecto a la mediana indicaron mayor mortalidad durante los 30 días del seguimiento (log-rango, $p = 0.0009$, Figura 13). Además, en un análisis por cuartiles de ST2, el riesgo tanto de muerte ($p = 0.001$) como de compuesto de muerte o de ICC ($p=0.001$) aumentó de manera gradual, escalonada, con mayores niveles de ST2. Esta asociación entre ST2 y episodios clínicos fue homogénea entre los dos ensayos individuales (TIMI 14 y ENTIRE-TIMI 23).

Tabla 7. Asociación entre concentración inicial de ST-2 (ng/mL) y resultados

Resultado (30días)	n	Mediana [25,75]	valor de p
Fallecidos	28	0.379 [0.267, 0.611]	0.0001
Vivos	782	0.233 [0.178, 0.340]	
IM	29	0.213 [0.171, 0.259]	0.11
Sin IM	781	0.237 [0.181, 0.348]	
ICC	21	0.287 [0.237, 0.470]	0.009
Sin ICC	789	0.233 [0.178, 0.345]	
Fallecidos/ICC	47	0.317 [0.246, 0.590]	<0.0001
Vivos/ICC	763	0.231 [0.177, 0.339]	

IM= Infarto de Miocardio; ICC = Insuficiencia Cardíaca Congestiva

Evolución de niveles séricos de ST2. Los niveles de ST2 iniciales analizados por cuartiles se correlacionaron significativamente con la duración con respecto a aleatorización (Tablas 5 y 6). Se esperaba que los niveles de ST2 aumentasen el primer día después de oclusión coronaria y que volviesen a la normalidad durante los 14 días siguientes (6). Entre los pacientes TIMI 14, el análisis de mediciones en serie de ST2 en suero en 228 pacientes reveló un aumento con el tiempo, alcanzando la mayoría de los pacientes un nivel máximo de ST2 a las 12 horas, sin embargo, algunos pacientes mantuvieron niveles séricos de ST2 que continuaron aumentando pasado este punto en el tiempo.

Análisis multivariante. Después de controlar las predicciones clínicas establecidas en IMEST, incluyendo edad, frecuencia cardíaca, presión sanguínea sistólica, localización del infarto de miocardio, clase Killip y duración desde la aparición del dolor torácico, niveles en aumento de ST2 conservaron un indicador independiente de muerte a los 30 días (OR 1.77; 95% CI 1.01 – 3.12, $p = 0.047$). Esta asociación ya fue significativa cuando se añadió PNC al modelo clínico (la evaluación se limitó a ENTIRE). También se evaluó la capacidad predictiva de ST2 determinada en momentos posteriores (3 y 12 horas en TIMI 14); revelando una asociación más fuerte entre ST2 y riesgo de mortalidad.

Por lo tanto, la T1/ST2 soluble en suero, es un nuevo biomarcador para insuficiencia cardíaca grave que es similar a la activación neurohormonal. En pacientes con insuficiencia cardíaca crónica aguda de clase III-IV de la NYHA, el cambio en los niveles de T1/ST2 es un indicador independiente del criterio de valoración de mortalidad o trasplante.

En este estudio, los autores de la presente invención exploraron la posible función de la medición en suero de un receptor recientemente identificado de la familia de interleucina-1 en infarto de miocardio agudo. La forma soluble de este receptor se secreta rápidamente por miocitos cardíacos cuando las células se sobrecargan biomecánicamente; esto sugiere que el receptor puede desempeñar una función en condiciones en las que el miocardio se sobrecarga rápidamente, tal como en un infarto de miocardio. Para explorar esto, los autores de la presente invención midieron los niveles séricos de ST2 en el momento de la presentación en una cohorte de pacientes con infarto de miocardio agudo. Los resultados demuestran que, en estos pacientes, los niveles de ST2 en el momento de la presentación están

asociados con hospitalización y mortalidad a los 30 días. Adicionalmente, análisis multivariante realizado indicó que el nivel de ST2 está asociado independientemente con el resultado después del control de factores clínicos importantes.

5 Por lo tanto, el significado de estos datos es doble. Primero, estos datos sugieren que la familia de receptores de interleucina, que participa en la defensa del hospedador y en la diferenciación de linfocitos T (Sims JE. IL-1 and IL-18 receptors, and their extended family. *Curr Opin Immunol.* 2002;14:117-22), puede participar en episodios tempranos de infarto de miocardio agudo. Estos datos implican que este receptor es una posible nueva diana para modificar el pronóstico en pacientes con infarto de miocardio. En segundo término, ST2 representa un nuevo biomarcador que ofrece información de pronóstico en pacientes con infarto de miocardio agudo; por tanto, extendiéndose sobre el trabajo
10 previo de los autores de la invención que demuestra una asociación entre ST2 y mortalidad entre pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva no isquémica (Weinberg EO, Shimp M, Hurwitz S, Tominaga S, Rouleau JL, Lee RT. Identification of serum soluble ST2 receptor as a novel heart failure biomarker. *Circulation.* 2003;107:721-6), otra afección de sobrecarga de miocardio.

15 Aunque no se excluye, es poco probable que la relación de ST2 y el resultado después de infarto de miocardio sea simplemente un reflejo de la asociación de incrementos crónicos en marcadores inflamatorios como PRC y riesgo de infarto de miocardio. Por sí mismos, los miocitos cardiacos pueden sintetizar ST2, al igual que PNC, y datos procedentes de pacientes sin enfermedad isquémica apreciable sugieren que ST2 predice pronóstico en ausencia de enfermedad arterial coronaria. Adicionalmente, datos preliminares sugieren que niveles de ST2 en pacientes no hospitalizados con enfermedad arterial coronaria estable no se relacionan con niveles de PRC. Aunque los datos de los autores de la presente invención constatan el valor complementario de ST2 para una valoración de riesgo cuando se
20 incluye a un modelo clínico sólido (puntuación de riesgo REF TIMI), ST2 no aporta información adicional con respecto al PNC en el conjunto de datos más pequeños limitados a ENTIRE-TIMI 23. También puede haber un valor de pronóstico de ST2 junto con otros biomarcadores disponibles.

Aunque ST2 puede secretarse por miocitos cardiacos sobrecargados mecánicamente, muchas células pueden secretar ST2. Por lo tanto, es posible que incrementos de ST2 en suero no sean completamente específicos de infarto de miocardio agudo. Además de insuficiencia cardiaca no isquémica (Weinberg EO, Shimp M, Hurwitz S, Tominaga S, Rouleau JL, Lee RT. Identification of serum soluble ST2 receptor as a novel insuficiencia cardíaca biomarker. *Circulation.* 2003;107:721-6), pacientes con asma (Oshikawa K, Kuroiwa K, Tago K, Iwahana H, Yanagisawa K, Ohno S, Tominaga SI, Sugiyama Y. Elevated soluble ST2-protein levels in sera of patients with asthma with an acute exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:277-81) o con enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico (Kuroiwa K, Arai T, Okazaki H, Minota S, Tominaga S. Identification of human ST2 protein in the sera of patients with autoimmune diseases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;284:1104-8) también pueden tener niveles de ST2 aumentados en suero. Por lo tanto, la utilidad de la medición de ST2 en el diagnóstico inicial de infarto de miocardio agudo en dichos pacientes no es inequívoco.

35 Sin embargo, ST2 sigue siendo una posible diana para terapia en pacientes con IM. Estos datos demuestran como la tecnología genómica puede revelar una posible nueva ruta patofisiológica en una enfermedad común. ST₂ se identificó inicialmente mediante estudios de la familia interleucina-1, pero su papel en enfermedad miocárdica solo se sugirió recientemente mediante estudios genómicos con micromatrices de ADN. Estudios con micromatrices de ADN permiten la identificación de posibles nuevas rutas de enfermedades, pero esto es únicamente una etapa inicial en el entendimiento del papel de la ruta. Los datos anteriores respaldan el papel de ST₂ en infarto de miocardio agudo, ya que
40 los niveles de ST₂ predicen resultados. Los estudios de la función de ST₂ en infarto de miocardio son posibles. Además, la identificación del ligando para los receptores de ST₂, solubles y de membrana, podría ayudar más a comprender los papeles posiblemente conflictivos de los receptores de membrana y solubles.

Los resultados descritos establecen que la T1/ST2 se secreta durante un ataque cardiaco y/o insuficiencia cardiaca y puede medirse fácilmente, respaldando de esta manera las utilidades declaradas en la presente invención.

45 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Brigham and Women's Hospital, Inc.

<120> IL1RL-1 COMO UN MARCADOR DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR Y DIANA TERAPÉUTICA

<130> B00801.70284.WO

<150> US 60/379.173

50 <151> 09-05-2002

<160> 8

ES 2 573 471 T3

<170> PatentIn versión 3.0

<210> 1

<211> 1357

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (47)..(1033)

<223> HUMST2M, D12763, NM_003856

10 <400> 1

```

atctcaacaa cgagttacca atacttgctc ttgattgata aacaga atg ggg ttt      55
                                     Met Gly Phe
                                     1
tgg atc tta gca att ctc aca att ctc atg tat tcc aca gca gca aag      103
Trp Ile Leu Ala Ile Leu Thr Ile Leu Met Tyr Ser Thr Ala Ala Lys
   5                               10                               15
ttt agt aaa caa tca tgg ggc ctg gaa aat gag gct tta att gta aga      151
Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile Val Arg
 20                               25                               30                               35
tgt cct aga caa gga aaa cct agt tac acc gtg gat tgg tat tac tca      199
Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp Tyr Tyr Ser
                               40                               45                               50
caa aca aac aaa agt att ccc act cag gaa aga aat cgt gtg ttt gcc      247
Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg Val Phe Ala
                               55                               60                               65
tca ggc caa ctt ctg aag ttt cta cca gct gaa gtt gct gat tct ggt      295
Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Glu Val Ala Asp Ser Gly
   70                               75                               80
att tat acc tgt att gtc aga agt ccc aca ttc aat agg act gga tat      343
Ile Tyr Thr Cys Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg Thr Gly Tyr
   85                               90                               95
gcg aat gtc acc ata tat aaa aaa caa tca gat tgc aat gtt cca gat      391
Ala Asn Val Thr Ile Tyr Lys Lys Gln Ser Asp Cys Asn Val Pro Asp
 100                               105                               110                               115
tat ttg atg tat tca aca gta tct gga tca gaa aaa aat tcc aaa att      439
Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val Ser Gly Ser Glu Lys Asn Ser Lys Ile
                               120                               125                               130
tat tgt cct acc att gac ctc tac aac tgg aca gca cct ctt gag tgg      487
Tyr Cys Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro Leu Glu Trp
                               135                               140                               145
ttt aag aat tgt cag gct ctt caa gga tca agg tac agg gcg cac aag      535
Phe Lys Asn Cys Gln Ala Leu Gln Gly Ser Arg Tyr Arg Ala His Lys
   150                               155                               160
tca ttt ttg gtc att gat aat gtg atg act gag gac gca ggt gat tac      583
Ser Phe Leu Val Ile Asp Asn Val Met Thr Glu Asp Ala Gly Asp Tyr

```

ES 2 573 471 T3

```

      165              170              175
acc tgt aaa ttt ata cac aat gaa aat gga gcc aat tat agt gtg acg      631
Thr Cys Lys Phe Ile His Asn Glu Asn Gly Ala Asn Tyr Ser Val Thr
180              185              190              195
gcg acc agg tcc ttc acg gtc aag gat gag caa ggc ttt tct ctg ttt      679
Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val Lys Asp Glu Gln Gly Phe Ser Leu Phe
      200              205              210
cca gta atc gga gcc cct gca caa aat gaa ata aag gaa gtg gaa att      727
Pro Val Ile Gly Ala Pro Ala Gln Asn Glu Ile Lys Glu Val Glu Ile
      215              220              225
gga aaa aac gca aac cta act tgc tct gct tgt ttt gga aaa ggc act      775
Gly Lys Asn Ala Asn Leu Thr Cys Ser Ala Cys Phe Gly Lys Gly Thr
      230              235              240
cag ttc ttg gct gcc gtc ctg tgg cag ctt aat gga aca aaa att aca      823
Gln Phe Leu Ala Ala Val Leu Trp Gln Leu Asn Gly Thr Lys Ile Thr
      245              250              255
gac ttt ggt gaa cca aga att caa caa gag gaa ggg caa aat caa agt      871
Asp Phe Gly Glu Pro Arg Ile Gln Gln Glu Glu Gly Gln Asn Gln Ser
260              265              270              275
ttc agc aat ggg ctg gct tgt cta gac atg gtt tta aga ata gct gac      919
Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Leu Asp Met Val Leu Arg Ile Ala Asp
      280              285              290
gtg aag gaa gag gat tta ttg ctg cag tac gac tgt ctg gcc ctg aat      967
Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Gln Tyr Asp Cys Leu Ala Leu Asn
      295              300              305
ttg cat ggc ttg aga agg cac acc gta aga cta agt agg aaa aat cca      1015
Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg Lys Asn Pro
      310              315              320
agt aag gag tgt ttc tga gactttgatc acctgaactt tctctagcaa      1063
Ser Lys Glu Cys Phe
      325
gtgtaagcag aatggagtgt ggttccaaga gatccatcaa gacaatggga atggcctgtg      1123
ccataaaatg tgcttctctt cttcgggatg ttgtttgctg tctgatcttt gtagactgtt      1183
cctgtttgct gggagcttct ctgctgctta aattgttugt cctccccac tccctcctat      1243
cgttggtttg tctagaacac tcagctgctt ctttggtcac ccttgttttc taactttatg      1303
aactcctct gtgtcactgt atgtgaaagg aatgcacca acaaccgaaa actg      1357

```

<210> 2

<211> 328

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Gly Phe Trp Ile Leu Ala Ile Leu Thr Ile Leu Met Tyr Ser Thr
1      5      10      15
Ala Ala Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu
20      25      30
Ile Val Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp
35      40      45
Tyr Tyr Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg
50      55      60
Val Phe Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Glu Val Ala
65      70      75      80
Asp Ser Gly Ile Tyr Thr Cys Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg
85      90      95
Thr Gly Tyr Ala Asn Val Thr Ile Tyr Lys Lys Gln Ser Asp Cys Asn
100     105     110
Val Pro Asp Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val Ser Gly Ser Glu Lys Asn
115     120     125
Ser Lys Ile Tyr Cys Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro
130     135     140
Leu Glu Trp Phe Lys Asn Cys Gln Ala Leu Gln Gly Ser Arg Tyr Arg

145      150      155      160
Ala His Lys Ser Phe Leu Val Ile Asp Asn Val Met Thr Glu Asp Ala
165     170     175
Gly Asp Tyr Thr Cys Lys Phe Ile His Asn Glu Asn Gly Ala Asn Tyr
180     185     190
Ser Val Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val Lys Asp Glu Gln Gly Phe
195     200     205
Ser Leu Phe Pro Val Ile Gly Ala Pro Ala Gln Asn Glu Ile Lys Glu
210     215     220
Val Glu Ile Gly Lys Asn Ala Asn Leu Thr Cys Ser Ala Cys Phe Gly
225     230     235     240
Lys Gly Thr Gln Phe Leu Ala Ala Val Leu Trp Gln Leu Asn Gly Thr
245     250     255
Lys Ile Thr Asp Phe Gly Glu Pro Arg Ile Gln Gln Glu Glu Gly Gln
260     265     270
Asn Gln Ser Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Leu Asp Met Val Leu Arg
275     280     285
Ile Ala Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Gln Tyr Asp Cys Leu
290     295     300
Ala Leu Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg
305     310     315     320
Lys Asn Pro Ser Lys Glu Cys Phe
325

```

<210> 3

<211> 2058

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (272)..(1942)

ES 2 573 471 T3

<223> AB012701

<400> 3

```

aaagagaggc tggctgttgt atttagtaaa gctataaagc tgtaagagaa attggctttc      60
tgagttgtga aactgtgggc agaaagttga ggaagaaaga actcaagtac aacccaatga      120
ggttgagata taggctactc ttcccaactc agtcttgaag agtatcacca actgcctcat      180
gtgtggtgac cttcactgtc gtatgccagt gactcatctg gagtaatctc aacaacgagt      240
taccaatact tgctcttgat tgataaacag a atg ggg ttt tgg atc tta gca      292
                               Met Gly Phe Trp Ile Leu Ala
                               1           5

att ctc aca att ctc atg tat tcc aca gca gca aag ttt agt aaa caa      340
Ile Leu Thr Ile Leu Met Tyr Ser Thr Ala Ala Lys Phe Ser Lys Gln
                               10           15           20

tca tgg ggc ctg gaa aat gag gct tta att gta aga tgt cct aga caa      388
Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile Val Arg Cys Pro Arg Gln
                               25           30           35

gga aaa cct agt tac acc gtg gat tgg tat tac tca caa aca aac aaa      436
Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp Tyr Tyr Ser Gln Thr Asn Lys
40           45           50           55

agt att ccc act cag gaa aga aat cgt gtg ttt gcc tca ggc caa ctt      484
Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg Val Phe Ala Ser Gly Gln Leu
                               60           65           70

ctg aag ttt cta cca gct gaa gtt gct gat tct ggt att tat acc tgt      532
Leu Lys Phe Leu Pro Ala Glu Val Ala Asp Ser Gly Ile Tyr Thr Cys
                               75           80           85

att gtc aga agt ccc aca ttc aat agg act gga tat gcg aat gtc acc      580
Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg Thr Gly Tyr Ala Asn Val Thr
                               90           95           100

ata tat aaa aaa caa tca gat tgc aat gtt cca gat tat ttg atg tat      628
Ile Tyr Lys Lys Gln Ser Asp Cys Asn Val Pro Asp Tyr Leu Met Tyr

```


ES 2 573 471 T3

```

Lys Ser Arg Arg His Ile Phe Ile Leu Thr Pro Gln Ile Thr His Asn
440                               445                               450                               455
aag gag ttt gcc tac gag cag gag gtt gcc ctg cac tgt gcc ctc atc      1684
Lys Glu Phe Ala Tyr Glu Gln Glu Val Ala Leu His Cys Ala Leu Ile
                               460                               465                               470
cag aac gac gcc aag gtg ata ctt att gag atg gag gct ctg agc gag      1732
Gln Asn Asp Ala Lys Val Ile Leu Ile Glu Met Glu Ala Leu Ser Glu
                               475                               480                               485
ctg gac atg ctg cag gct gag gcg ctt cag gac tcc ctc cag cat ctt      1780
Leu Asp Met Leu Gln Ala Glu Ala Leu Gln Asp Ser Leu Gln His Leu
                               490                               495                               500
atg aaa gta cag ggg acc atc aag tgg agg gag gac cac att gcc aat      1828
Met Lys Val Gln Gly Thr Ile Lys Trp Arg Glu Asp His Ile Ala Asn
                               505                               510                               515
aaa agg tcc ctg aat tcc aaa ttc tgg aag cac gtg agg tac caa atg      1876
Lys Arg Ser Leu Asn Ser Lys Phe Trp Lys His Val Arg Tyr Gln Met
520                               525                               530                               535
cct gtg cca agc aaa att ccc aga aag gcc tct agt ttg act ccc ttg      1924
Pro Val Pro Ser Lys Ile Pro Arg Lys Ala Ser Ser Leu Thr Pro Leu
                               540                               545                               550
gct gcc cag aag caa tag tgccctgctgt gatgtgcaaa gggatctggg      1972
Ala Ala Gln Lys Gln
                               555
tttgaagctt tcttgacttc tcttagctgg cttatgcccc tgcactgaag tgtgaggagc      2032
gggaatatta aaggattca ggccac      2058

```

<210> 4

<211> 556

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 573 471 T3

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

Lys Gly Thr Gln Phe Leu Ala Ala Val Leu Trp Gln Leu Asn Gly Thr
 245 250 255
 Lys Ile Thr Asp Phe Gly Glu Pro Arg Ile Gln Gln Glu Glu Gly Gln
 260 265 270
 Asn Gln Ser Phe Ser Asn Gly Leu Ala Cys Leu Asp Met Val Leu Arg
 275 280 285
 Ile Ala Asp Val Lys Glu Glu Asp Leu Leu Leu Gln Tyr Asp Cys Leu
 290 295 300
 Ala Leu Asn Leu His Gly Leu Arg Arg His Thr Val Arg Leu Ser Arg
 305 310 315 320
 Lys Asn Pro Ile Asp His His Ser Ile Tyr Cys Ile Ile Ala Val Cys
 325 330 335
 Ser Val Phe Leu Met Leu Ile Asn Val Leu Val Ile Ile Leu Lys Met
 340 345 350
 Phe Trp Ile Glu Ala Thr Leu Leu Trp Arg Asp Ile Ala Lys Pro Tyr
 355 360 365
 Lys Thr Arg Asn Asp Gly Lys Leu Tyr Asp Ala Tyr Val Val Tyr Pro
 370 375 380
 Arg Asn Tyr Lys Ser Ser Thr Asp Gly Ala Ser Arg Val Glu His Phe
 385 390 395 400
 Val His Gln Ile Leu Pro Asp Val Leu Glu Asn Lys Cys Gly Tyr Thr
 405 410 415
 Leu Cys Ile Tyr Gly Arg Asp Met Leu Pro Gly Glu Asp Val Val Thr
 420 425 430
 Ala Val Glu Thr Asn Ile Arg Lys Ser Arg Arg His Ile Phe Ile Leu
 435 440 445
 Thr Pro Gln Ile Thr His Asn Lys Glu Phe Ala Tyr Glu Gln Glu Val
 450 455 460
 Ala Leu His Cys Ala Leu Ile Gln Asn Asp Ala Lys Val Ile Leu Ile
 465 470 475 480
 Glu Met Glu Ala Leu Ser Glu Leu Asp Met Leu Gln Ala Glu Ala Leu
 485 490 495
 Gln Asp Ser Leu Gln His Leu Met Lys Val Gln Gly Thr Ile Lys Trp
 500 505 510
 Arg Glu Asp His Ile Ala Asn Lys Arg Ser Leu Asn Ser Lys Phe Trp
 515 520 525
 Lys His Val Arg Tyr Gln Met Pro Val Pro Ser Lys Ile Pro Arg Lys
 530 535 540
 Ala Ser Ser Leu Thr Pro Leu Ala Ala Gln Lys Gln
 545 550 555

<210> 5

<211> 2586

<212> ADN

5 <213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (202)..(1212)

<223> Fit-1S

10 <400> 5

ES 2 573 471 T3

```

gggtagtctg aagagaccag aggaaggagc accaagtagc ctcagggccc tgggtttatt    60
cttcccagcc cttcatctgg gctacactga tttctctttt ggacctaca tcagacagca    120
cacatcaacc gcttagtgga ctcaccgta ccttcctgtg ccattgocat cggagagatc    180
tcggccatca atcactagca c atg att ggc aaa tgg aga atg ggg ctt tgg    231
                               Met Ile Gly Lys Trp Arg Met Gly Leu Trp
                               1           5           10
gct ttg gca att ctg aca gtt ccc atg tat ttc ata gtg aca gag ggc    279
Ala Leu Ala Ile Leu Thr Val Pro Met Tyr Phe Ile Val Thr Glu Gly
                               15           20           25
aga aaa aca tcc tgg ggt cta gaa aac gag gct tta att gtc aga tgc    327

```

ES 2 573 471 T3

Arg Lys Thr Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile Val Arg Cys
30 35 40
ccc caa aga gga ggt gcg att aac cct gtg gaa tgg tat tat tca aat 375
Pro Gln Arg Gly Gly Ala Ile Asn Pro Val Glu Trp Tyr Tyr Ser Asn
45 50 55
aca aat gaa aga att cct act caa aag aga aat cgg atc ttc gtc tca 423
Thr Asn Glu Arg Ile Pro Thr Gln Lys Arg Asn Arg Ile Phe Val Ser
60 65 70
aga gat cgt ctg aag ttt cta cca gcc aaa gtg gaa gac tct ggg att 471
Arg Asp Arg Leu Lys Phe Leu Pro Ala Lys Val Glu Asp Ser Gly Ile
75 80 85 90
tat acg tgt gtt atc aga agc cct gaa tcg att aag acc gga tct ttg 519
Tyr Thr Cys Val Ile Arg Ser Pro Glu Ser Ile Lys Thr Gly Ser Leu
95 100 105
aat gtc acc ata tat aaa aga cca cca aac tgc aaa atc cct gat tac 567
Asn Val Thr Ile Tyr Lys Arg Pro Pro Asn Cys Lys Ile Pro Asp Tyr
110 115 120
atg atg tac tcg aca gta gat gga tca gat aaa aat tcc aag ata aca 615
Met Met Tyr Ser Thr Val Asp Gly Ser Asp Lys Asn Ser Lys Ile Thr
125 130 135
tgt cca aca att gcc ttg tat aat tgg aca gcg cct gtt cag tgg ttt 663
Cys Pro Thr Ile Ala Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro Val Gln Trp Phe
140 145 150
aag aac tgc aaa got ctc caa ggg cca agg ttc agg gca cac atg tcc 711
Lys Asn Cys Lys Ala Leu Gln Gly Pro Arg Phe Arg Ala His Met Ser
155 160 165 170
tat ttg ttc att gac aaa gtg agt cat gtt gat gaa ggt gac tac aca 759
Tyr Leu Phe Ile Asp Lys Val Ser His Val Asp Glu Gly Asp Tyr Thr
175 180 185
tgt cga ttc act cac acg gag aac gga acc aat tac att gtg act gcc 807
Cys Arg Phe Thr His Thr Glu Asn Gly Thr Asn Tyr Ile Val Thr Ala
190 195 200
acc aga tca ttc aca gtt gaa gaa aaa ggc ttc tct aca ttt cca gta 855
Thr Arg Ser Phe Thr Val Glu Glu Lys Gly Phe Ser Thr Phe Pro Val
205 210 215
att aca aac cct cca cac aac tac aca gtg gaa gtg gaa ata gga aaa 903
Ile Thr Asn Pro Pro His Asn Tyr Thr Val Glu Val Glu Ile Gly Lys
220 225 230
aca gca aac att gcc tgc tca gct tgc ttt ggc aca gcc tct cag ttc 951
Thr Ala Asn Ile Ala Cys Ser Ala Cys Phe Gly Thr Ala Ser Gln Phe
235 240 245 250
gtt gct gtc ctg tgg cag att aac aaa acg aga att gga tct ttt ggc 999
Val Ala Val Leu Trp Gln Ile Asn Lys Thr Arg Ile Gly Ser Phe Gly
255 260 265
aaa gca aga att caa gaa gag aaa ggc cca aat aaa agt tcc agc aat 1047
Lys Ala Arg Ile Gln Glu Glu Lys Gly Pro Asn Lys Ser Ser Ser Asn
270 275 280
ggc atg att tgc tta acc tca ctg tta agg ata act ggt gtg acc gac 1095
Gly Met Ile Cys Leu Thr Ser Leu Leu Arg Ile Thr Gly Val Thr Asp
285 290 295
aag gac ttc tcc ctg aaa tat gac tgt gtg gcc atg aac cat cac gga 1143
Lys Asp Phe Ser Leu Lys Tyr Asp Cys Val Ala Met Asn His His Gly
300 305 310
gtg ata agg cac ccc gta aga ctg aga agg aaa caa cca agt aag gag 1191
Val Ile Arg His Pro Val Arg Leu Arg Arg Lys Gln Pro Ser Lys Glu
315 320 325 330
tgt ctc tca caa att gct tga caaaattggc tgaatttgc t gcaaccaca 1242
Cys Leu Ser Gln Ile Ala
335
atccttttttc tcagaggact gtgtgttata gcttggtccc aggggattca tcatgatcgt 1302
gggattagtt ggccagtttc ctcaaattgt tttttcatgt tgagaaagct ccttaaatct 1362
ggctctgtcca gaatgtttct gtcttctaga aggactctct gtcattgtat ctttctctc 1422

ES 2 573 471 T3

tctgtttccc	cttgtccttg	ttctcctcac	ggctcctccc	atcccttcac	cttccttcac	1482
gttctctcta	ctcttcttcc	cttatctctg	ggctccttct	cacctgtag	tggcttcttc	1542
agtcaccctt	tgcacatgct	acaagggaca	ttgggtgtga	tactgggttg	gaagcagtaa	1602
taaccctact	gtgtttctcc	ctttgtgact	cttgtaacag	aaaacaactt	acacattagg	1662
tggatgacca	acttgatccc	attttaaaag	agtagagaaa	acatgatatt	tttaccctta	1722
acactctctt	atgatactaa	ccactgcctc	aatggcaata	caactaatgt	aaaaacatta	1782
ttttaacttc	tttcaaata	caagaggggtg	tggaagggag	agagacactg	actctaagct	1842
catagtgata	tgtggggcat	ttattgggat	taagatattg	attaaatgat	taggggtggg	1902
gtacctattg	gataccatca	agctgtgtca	ctgcctgaag	tggtagttgg	gatttttttt	1962
tggttctggt	tgtcttcttt	ggtttgtttt	aactatagag	accattctgc	tcttgaactc	2022
ctagagttcc	acctggcttt	gcctctcagg	tcctgggatt	aaagccatat	gtcaccttac	2082
ccagccagga	tgtttcttgt	tttggtttca	attttagagc	ctctggcttg	taagattttt	2142
ataaagtaga	gtttgattca	taggtggcca	gagttgtgac	tcatagatgg	gttttagtga	2202
ggcttaggc	atccaccctt	tataatgctg	ttaccaggg	tgactgtgga	ccacagcact	2262
gtgttatgag	atggtggagg	tcatggcaca	ttctatagga	aaagagaagc	caagccccta	2322
gtctcaccag	gcacaacctt	gagtcctcac	tgctctcctc	tgccaacagg	accttttgtc	2382
cagatttctg	agtattctct	agttacattt	gtatttgaac	tatatttbtg	ttatctgtaa	2442
ttctgtattt	gttttgtttg	tgtgtgggtt	tgtattttcc	agattatttt	taattcacct	2502
gttgcatttc	aatcaatgt	atctgtactg	cttcatcaac	acagcctggt	aaataaaaagt	2562
cgtgtctggt	gttgttgaat	gata				2586

<210> 6

<211> 336

<212> PRT

5 <213> Rattus norvegicus

<400> 6

Met Ile Gly Lys Trp Arg Met Gly Leu Trp Ala Leu Ala Ile Leu Thr
 1 5 10 15
 Val Pro Met Tyr Phe Ile Val Thr Glu Gly Arg Lys Thr Ser Trp Gly
 20 25 30
 Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile Val Arg Cys Pro Gln Arg Gly Gly Ala
 35 40 45
 Ile Asn Pro Val Glu Trp Tyr Tyr Ser Asn Thr Asn Glu Arg Ile Pro
 50 55 60
 Thr Gln Lys Arg Asn Arg Ile Phe Val Ser Arg Asp Arg Leu Lys Phe
 65 70 75 80
 Leu Pro Ala Lys Val Glu Asp Ser Gly Ile Tyr Thr Cys Val Ile Arg
 85 90 95
 Ser Pro Glu Ser Ile Lys Thr Gly Ser Leu Asn Val Thr Ile Tyr Lys
 100 105 110
 Arg Pro Pro Asn Cys Lys Ile Pro Asp Tyr Met Met Tyr Ser Thr Val
 115 120 125
 Asp Gly Ser Asp Lys Asn Ser Lys Ile Thr Cys Pro Thr Ile Ala Leu
 130 135 140
 Tyr Asn Trp Thr Ala Pro Val Gln Trp Phe Lys Asn Cys Lys Ala Leu
 145 150 155 160
 Gln Gly Pro Arg Phe Arg Ala His Met Ser Tyr Leu Phe Ile Asp Lys
 165 170 175
 Val Ser His Val Asp Glu Gly Asp Tyr Thr Cys Arg Phe Thr His Thr
 180 185 190
 Glu Asn Gly Thr Asn Tyr Ile Val Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val
 195 200 205
 Glu Glu Lys Gly Phe Ser Thr Phe Pro Val Ile Thr Asn Pro Pro His
 210 215 220
 Asn Tyr Thr Val Glu Val Glu Ile Gly Lys Thr Ala Asn Ile Ala Cys
 225 230 235 240
 Ser Ala Cys Phe Gly Thr Ala Ser Gln Phe Val Ala Val Leu Trp Gln
 245 250 255
 Ile Asn Lys Thr Arg Ile Gly Ser Phe Gly Lys Ala Arg Ile Gln Glu
 260 265 270
 Glu Lys Gly Pro Asn Lys Ser Ser Ser Asn Gly Met Ile Cys Leu Thr
 275 280 285
 Ser Leu Leu Arg Ile Thr Gly Val Thr Asp Lys Asp Phe Ser Leu Lys
 290 295 300
 Tyr Asp Cys Val Ala Met Asn His His Gly Val Ile Arg His Pro Val
 305 310 315 320
 Arg Leu Arg Arg Lys Gln Pro Ser Lys Glu Cys Leu Ser Gln Ile Ala
 325 330 335

<210> 7

<211> 2065

<212> ADN

5 <213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

ES 2 573 471 T3

<222> (275)..(1975)

<223> Fit-1M

<400> 7

```

aggagaaaag actgggatat gctagcttgc tagctccagc aagcggcggt atgcgcggtc      60
tttaaaatag acagacatag aggctttggg ggagaggaag aagtgcctgg gatgaagaag      120
agatgcacct acceggcagg ggtgaaatcc caagctacac tgatttctct tttggaccct      180
acatcagaca gcacacatca accgcctagt ggactcaccg ttaccttccct gtgccattgc      240
catcggagag atctcggcca tcaatcacta gcac atg att ggc aaa tgg aga atg      295
                               Met Ile Gly Lys Trp Arg Met
                               1           5
ggg ctt tgg gct ttg gca att ctg aca gtt ccc atg tat ttc ata gtg      343
Gly Leu Trp Ala Leu Ala Ile Leu Thr Val Pro Met Tyr Phe Ile Val
                               10           15           20
aca gag ggc aga aaa aca tcc tgg ggt cta gaa aac gag gct tta att      391
Thr Glu Gly Arg Lys Thr Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile
                               25           30           35
gtc aga tgc ccc caa aga gga ggt gcg att aac cct gtg gaa tgg tat      439
Val Arg Cys Pro Gln Arg Gly Gly Ala Ile Asn Pro Val Glu Trp Tyr
                               40           45           50           55
tat tca aat aca aat gaa aga att cct act caa aag aga aat cgg atc      487
Tyr Ser Asn Thr Asn Glu Arg Ile Pro Thr Gln Lys Arg Asn Arg Ile
                               60           65           70
ttc gtc tca aga gat cgt ctg aag ttt cta cca gcc aaa gtg gaa gac      535
Phe Val Ser Arg Asp Arg Leu Lys Phe Leu Pro Ala Lys Val Glu Asp
                               75           80           85
tct ggg att tat acg tgt gtt atc aga agc cct gaa tcg att aag acc      583
Ser Gly Ile Tyr Thr Cys Val Ile Arg Ser Pro Glu Ser Ile Lys Thr
                               90           95           100
gga tct ttg aat gtc acc ata tat aaa aga cca cca aac tgc aaa atc      631
Gly Ser Leu Asn Val Thr Ile Tyr Lys Arg Pro Pro Asn Cys Lys Ile
                               105           110           115
cct gat tac atg atg tac tcg aca gta gat gga tca gat aaa aat tcc      679
Pro Asp Tyr Met Met Tyr Ser Thr Val Asp Gly Ser Asp Lys Asn Ser
                               120           125           130           135
aag ata aca tgt cca aca att gcc ttg tat aat tgg aca gcg cct gtt      727
Lys Ile Thr Cys Pro Thr Ile Ala Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro Val
                               140           145           150
cag tgg ttt aag aac tgc aaa gct ctc caa ggg cca agg ttc agg gca      775
Gln Trp Phe Lys Asn Cys Lys Ala Leu Gln Gly Pro Arg Phe Arg Ala
                               155           160           165
cac atg tcc tat ttg ttc att gac aaa gtg agt cat gtt gat gaa ggt      823
His Met Ser Tyr Leu Phe Ile Asp Lys Val Ser His Val Asp Glu Gly
                               170           175           180
gac tac aca tgt cga ttc act cac acg gag aac gga acc aat tac att      871
Asp Tyr Thr Cys Arg Phe Thr His Thr Glu Asn Gly Thr Asn Tyr Ile
                               185           190           195

```

ES 2 573 471 T3

gtg act gcc acc aga tca ttc aca gtt gaa gaa aaa ggc ttc tct aca 919
Val Thr Ala Thr Arg Ser Phe Thr Val Glu Glu Lys Gly Phe Ser Thr
200 205 210 215
ttt cca gta att aca aac cct cca cac aac tac aca gtg gaa gtg gaa 967
Phe Pro Val Ile Thr Asn Pro Pro His Asn Tyr Thr Val Glu Val Glu
220 225 230
ata gga aaa aca gca aac att gcc tgc tca gct tgc ttt ggc aca gcc 1015
Ile Gly Lys Thr Ala Asn Ile Ala Cys Ser Ala Cys Phe Gly Thr Ala
235 240 245
tct cag ttc gtt gct gtc ctg tgg cag att aac aaa acg aga att gga 1063
Ser Gln Phe Val Ala Val Leu Trp Gln Ile Asn Lys Thr Arg Ile Gly
250 255 260
tct ttt ggc aaa gca aga att caa gaa gag aaa ggc cca aat aaa agt 1111
Ser Phe Gly Lys Ala Arg Ile Gln Glu Glu Lys Gly Pro Asn Lys Ser
265 270 275
tcc agc aat ggc atg att tgc tta acc tca ctg tta agg ata act ggt 1159
Ser Ser Asn Gly Met Ile Cys Leu Thr Ser Leu Leu Arg Ile Thr Gly
280 285 290 295
gtg acc gac aag gac ttc tcc ctg aaa tat gac tgt gtg gcc atg aac 1207
Val Thr Asp Lys Asp Phe Ser Leu Lys Tyr Asp Cys Val Ala Met Asn
300 305 310
cat cac gga gtg ata agg cac ccc gta aga ctg aga agg aaa caa cca 1255
His His Gly Val Ile Arg His Pro Val Arg Leu Arg Arg Lys Gln Pro
315 320 325
att gac cac caa agc acc tac tac ata gtt gcc gga tgt agt tta ttg 1303
Ile Asp His Gln Ser Thr Tyr Tyr Ile Val Ala Gly Cys Ser Leu Leu
330 335 340
cta atg ttt atc aat gtc ttg gtg ata gtc tta aaa gtg ttc tgg att 1351
Leu Met Phe Ile Asn Val Leu Val Ile Val Leu Lys Val Phe Trp Ile
345 350 355
gag gtt gct ctg ttc tgg aga gat ata atg gca cct tac aaa acc cag 1399
Glu Val Ala Leu Phe Trp Arg Asp Ile Met Ala Pro Tyr Lys Thr Gln
360 365 370 375
aat gat gga aag ctc tat gat gct tac atc att tac cct cgg gtc ttc 1447
Asn Asp Gly Lys Leu Tyr Asp Ala Tyr Ile Ile Tyr Pro Arg Val Phe
380 385 390
cgg ggc agc gca gca ggg acc ggc tct gtg gag tac ttt gtt cac tac 1495
Arg Gly Ser Ala Ala Gly Thr Gly Ser Val Glu Tyr Phe Val His Tyr
395 400 405
act ctg ccc gac gtt ctc gaa aat aaa tgt ggc tac aag ttg tgc att 1543
Thr Leu Pro Asp Val Leu Glu Asn Lys Cys Gly Tyr Lys Leu Cys Ile
410 415 420
tac ggg aga gac ctg ctg cct ggg caa gat gcg gcc act gtg gtg gaa 1591
Tyr Gly Arg Asp Leu Leu Pro Gly Gln Asp Ala Ala Thr Val Val Glu
425 430 435
agc agt atc cag aat agt aga cgg caa gtg ttt gtc ctg gcc cct cac 1639
Ser Ser Ile Gln Asn Ser Arg Arg Gln Val Phe Val Leu Ala Pro His
440 445 450 455
atg atg cac agc aaa gag ttt gcc tat gag cag gag atc gcc ctg cac 1687
Met Met His Ser Lys Glu Phe Ala Tyr Glu Gln Glu Ile Ala Leu His
460 465 470
agc gcc ctc atc cag aac aac tcc aag gtg att ctg att gaa atg gag 1735
Ser Ala Leu Ile Gln Asn Asn Ser Lys Val Ile Leu Ile Glu Met Glu
475 480 485
cct atg ggt gag gca agc cga ctg cag ctt ggg gat ctg caa gat tct 1783
Pro Met Gly Glu Ala Ser Arg Leu Gln Leu Gly Asp Leu Gln Asp Ser
490 495 500
ctc cag cat ctt gtg aaa atg cag ggg acc atc aag tgg agg gaa gac 1831
Leu Gln His Leu Val Lys Met Gln Gly Thr Ile Lys Trp Arg Glu Asp
505 510 515
cac gtg gcc gac aaa cag tct cta agc tcc aaa ttc tgg aag cat gtg 1879
His Val Ala Asp Lys Gln Ser Leu Ser Ser Lys Phe Trp Lys His Val

ES 2 573 471 T3

```

520          525          530          535
aga tac caa atg cca gtc ccg aaa aga ccc ccc aag atg gca tct gtt      1927
Arg Tyr Gln Met Pro Val Pro Lys Arg Pro Pro Lys Met Ala Ser Val
          540          545          550
gcc gct ccg ttg agt ggc aag gtg tgc ttg gac ctg aaa cac ttt tga      1975
Ala Ala Pro Leu Ser Gly Lys Val Cys Leu Asp Leu Lys His Phe
          555          560          565
gtcgtggact tgcctactca gagctgggga atcccagcag taggccccag aagtgaaggt      2035
gtgaagactt gaaatgccaa ggggtggggcc      2065

```

<210> 8

<211> 566

<212> PRT

5 <213> Rattus norvegicus

<400> 8

Met	Ile	Gly	Lys	Trp	Arg	Met	Gly	Leu	Trp	Ala	Leu	Ala	Ile	Leu	Thr
1			5						10					15	
Val	Pro	Met	Tyr	Phe	Ile	Val	Thr	Glu	Gly	Arg	Lys	Thr	Ser	Trp	Gly
			20					25					30		
Leu	Glu	Asn	Glu	Ala	Leu	Ile	Val	Arg	Cys	Pro	Gln	Arg	Gly	Gly	Ala
		35					40					45			
Ile	Asn	Pro	Val	Glu	Trp	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Thr	Asn	Glu	Arg	Ile	Pro
	50					55					60				
Thr	Gln	Lys	Arg	Asn	Arg	Ile	Phe	Val	Ser	Arg	Asp	Arg	Leu	Lys	Phe
65				70						75					80
Leu	Pro	Ala	Lys	Val	Glu	Asp	Ser	Gly	Ile	Tyr	Thr	Cys	Val	Ile	Arg
				85					90					95	
Ser	Pro	Glu	Ser	Ile	Lys	Thr	Gly	Ser	Leu	Asn	Val	Thr	Ile	Tyr	Lys
			100					105					110		
Arg	Pro	Pro	Asn	Cys	Lys	Ile	Pro	Asp	Tyr	Met	Met	Tyr	Ser	Thr	Val
			115				120					125			
Asp	Gly	Ser	Asp	Lys	Asn	Ser	Lys	Ile	Thr	Cys	Pro	Thr	Ile	Ala	Leu
	130					135					140				
Tyr	Asn	Trp	Thr	Ala	Pro	Val	Gln	Trp	Phe	Lys	Asn	Cys	Lys	Ala	Leu
145					150					155					160
Gln	Gly	Pro	Arg	Phe	Arg	Ala	His	Met	Ser	Tyr	Leu	Phe	Ile	Asp	Lys
				165					170					175	
Val	Ser	His	Val	Asp	Glu	Gly	Asp	Tyr	Thr	Cys	Arg	Phe	Thr	His	Thr
			180					185					190		
Glu	Asn	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ile	Val	Thr	Ala	Thr	Arg	Ser	Phe	Thr	Val
		195					200					205			
Glu	Glu	Lys	Gly	Phe	Ser	Thr	Phe	Pro	Val	Ile	Thr	Asn	Pro	Pro	His
	210					215					220				
Asn	Tyr	Thr	Val	Glu	Val	Glu	Ile	Gly	Lys	Thr	Ala	Asn	Ile	Ala	Cys
225					230						235				240
Ser	Ala	Cys	Phe	Gly	Thr	Ala	Ser	Gln	Phe	Val	Ala	Val	Leu	Trp	Gln
				245					250					255	
Ile	Asn	Lys	Thr	Arg	Ile	Gly	Ser	Phe	Gly	Lys	Ala	Arg	Ile	Gln	Glu
			260					265					270		
Glu	Lys	Gly	Pro	Asn	Lys	Ser	Ser	Ser	Asn	Gly	Met	Ile	Cys	Leu	Thr
		275					280					285			
Ser	Leu	Leu	Arg	Ile	Thr	Gly	Val	Thr	Asp	Lys	Asp	Phe	Ser	Leu	Lys
	290					295					300				
Tyr	Asp	Cys	Val	Ala	Met	Asn	His	His	Gly	Val	Ile	Arg	His	Pro	Val
305					310					315					320
Arg	Leu	Arg	Arg	Lys	Gln	Pro	Ile	Asp	His	Gln	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ile
				325					330					335	
Val	Ala	Gly	Cys	Ser	Leu	Leu	Leu	Met	Phe	Ile	Asn	Val	Leu	Val	Ile
			340					345					350		
Val	Leu	Lys	Val	Phe	Trp	Ile	Glu	Val	Ala	Leu	Phe	Trp	Arg	Asp	Ile
		355					360						365		

ES 2 573 471 T3

Met	Ala	Pro	Tyr	Lys	Thr	Gln	Asn	Asp	Gly	Lys	Leu	Tyr	Asp	Ala	Tyr
	370					375					380				
Ile	Ile	Tyr	Pro	Arg	Val	Phe	Arg	Gly	Ser	Ala	Ala	Gly	Thr	Gly	Ser
385					390					395					400
Val	Glu	Tyr	Phe	Val	His	Tyr	Thr	Leu	Pro	Asp	Val	Leu	Glu	Asn	Lys
			405						410					415	
Cys	Gly	Tyr	Lys	Leu	Cys	Ile	Tyr	Gly	Arg	Asp	Leu	Leu	Pro	Gly	Gln
			420					425					430		
Asp	Ala	Ala	Thr	Val	Val	Glu	Ser	Ser	Ile	Gln	Asn	Ser	Arg	Arg	Gln
	435						440					445			
Val	Phe	Val	Leu	Ala	Pro	His	Met	Met	His	Ser	Lys	Glu	Phe	Ala	Tyr
	450					455					460				
Glu	Gln	Glu	Ile	Ala	Leu	His	Ser	Ala	Leu	Ile	Gln	Asn	Asn	Ser	Lys
465					470						475				480
Val	Ile	Leu	Ile	Glu	Met	Glu	Pro	Met	Gly	Glu	Ala	Ser	Arg	Leu	Gln
				485					490					495	
Leu	Gly	Asp	Leu	Gln	Asp	Ser	Leu	Gln	His	Leu	Val	Lys	Met	Gln	Gly
			500					505					510		
Thr	Ile	Lys	Trp	Arg	Glu	Asp	His	Val	Ala	Asp	Lys	Gln	Ser	Leu	Ser
		515					520					525			
Ser	Lys	Phe	Trp	Lys	His	Val	Arg	Tyr	Gln	Met	Pro	Val	Pro	Lys	Arg
	530					535					540				
Pro	Pro	Lys	Met	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Leu	Ser	Gly	Lys	Val	Cys
545					550					555					560
Leu	Asp	Leu	Lys	His	Phe										
				565											

Reivindicaciones

1. Un procedimiento *in vitro* para:

- 5 evaluar la probabilidad de que un sujeto se beneficiará del tratamiento con un agente seleccionado del grupo que consiste en un agente antiinflamatorio, un agente antitrombótico, un agente antiplaquetario, un agente fibrinolítico, un agente hipolipemiente, un inhibidor directo de la trombina, un inhibidor del receptor de la glicoproteína IIb/IIIa, un anticuerpo de molécula de adhesión anti-celular monoclonal o policlonal que inhibe la capacidad de los leucocitos para unir a las moléculas de adhesión celular, un bloqueador del canal de calcio, un bloqueador del receptor beta-adrenérgico, un inhibidor de la ciclooxigenasa-2, y un inhibidor del sistema renina-angiotensina, en donde el procedimiento comprende:
- 10 la obtención de un primer nivel de proteína IL1RL-1 soluble en una muestra de un sujeto;
- la comparación del nivel de la proteína IL1RL-1 soluble a un valor predeterminado específico para el diagnóstico de una afección cardiovascular seleccionada entre infarto de miocardio e insuficiencia cardíaca, en donde el valor predeterminado es un solo valor de límite, y en donde un nivel de la proteína IL1RL-1 soluble igual o por encima del valor de límite predeterminado es indicativo de si el sujeto se beneficiará del tratamiento con dicho agente.
- 15 2. Un procedimiento como el reivindicado en la reivindicación 1, en donde la proteína IL1RL-1 soluble es un producto de expresión de una secuencia de ácido nucleico tal como se establece en SEC ID N°: 1, o comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEC ID N°: 2 .
- 20 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde el bloqueador del receptor beta-adrenérgico se selecciona del grupo que consiste en: atenolol, acebutolol, alprenolol, betunolol, betaxolol, bunitrolol, carteolol, celiprolol, hedroxalol, indenolol, labetalol, levobunolol, mepindolol, metipranol, metindol, metoprolol, metrizoranolol, oxprenolol, pindolol, propranolol, practolol, sotalolnadolol, tiprenolol, tomalolol, timolol, bupranolol, penbutolol, trimepranol, 2-(3-(1,1-dimetiletil)-amino-2-hidroxi-propoxi)-3-piridenocarbonitril clorhidrato, 1-butilamino-3-(2,5-dichlorofenoxi)-2-propanol, 1-isopropilamino-3-(4-(2-ciclopropilmetoxietil)fenoxi)-2-propanol, 3-isopropilamino-1-(7-metilindan-4-iloxi)-2-butanol, y 2-(3-t-butilamino-2-hidroxi-propiltio)-4-(5-carbamoil-2-tienil)tiazol, 7-(2-hidroxi-3-tbutilaminpropoxi) ftalida.
- 25 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde el inhibidor del sistema renina-angiotensina se selecciona del grupo que consiste en: un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE), un antagonista del receptor de la angiotensina II, un agente que activa el catabolismo de la angiotensina II, y un agente que impide la síntesis de la angiotensina I.
5. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en donde la muestra es sangre o suero.
- 30 6. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en donde el sujeto está libre de síntomas que requieran del tratamiento con el agente.
7. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en donde el sujeto es humano.

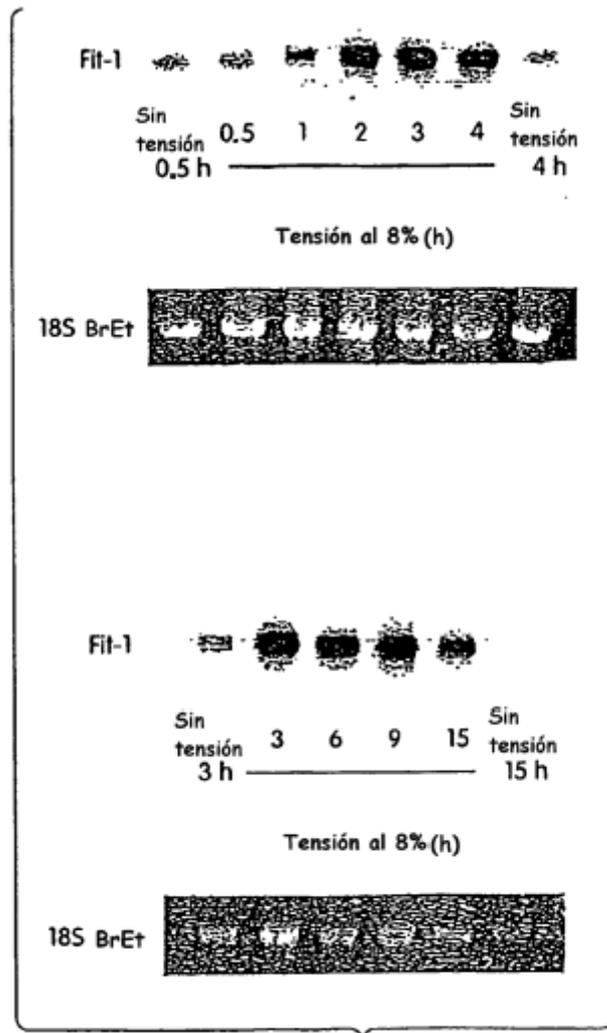


Fig. 1

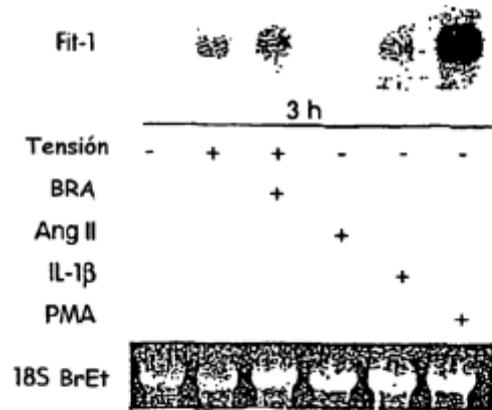


Fig. 2

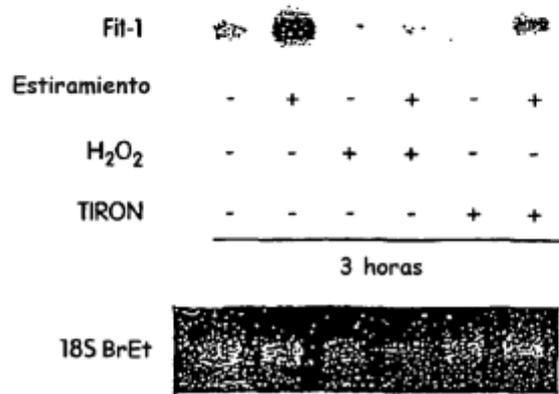


Fig. 3

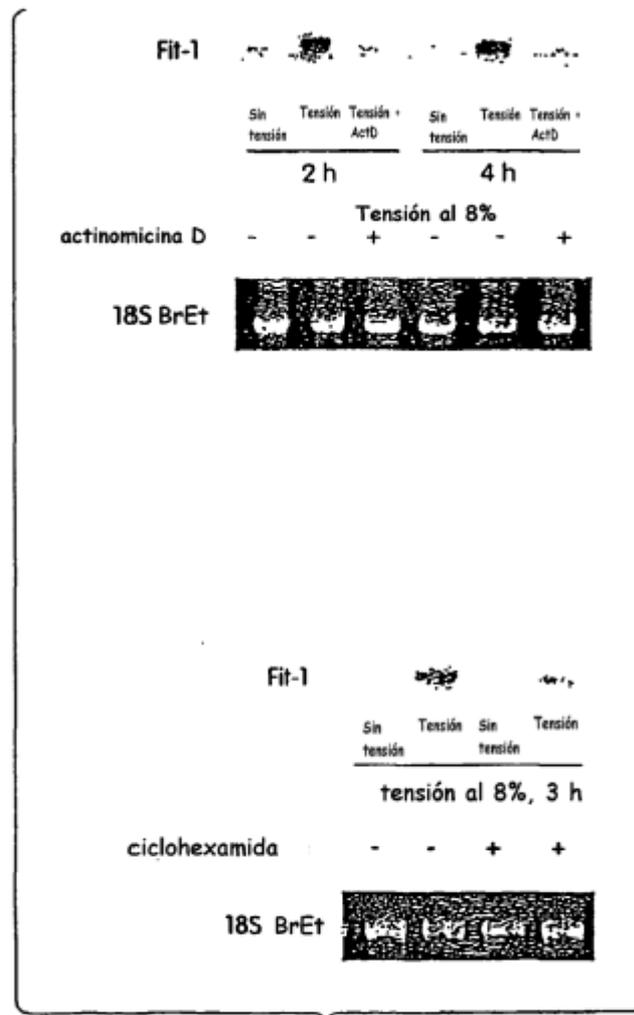


Fig. 4

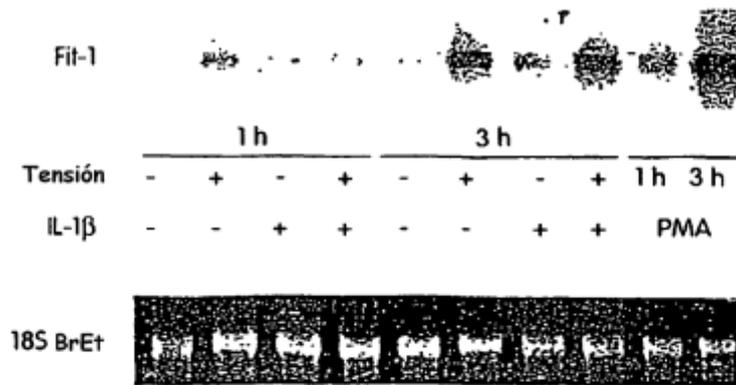


Fig. 5

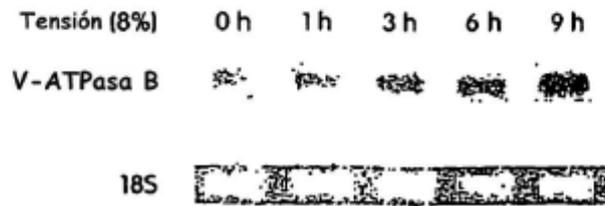


Fig. 6

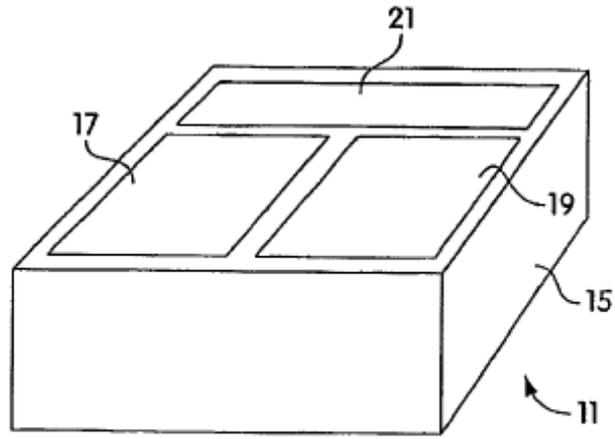


Fig. 7

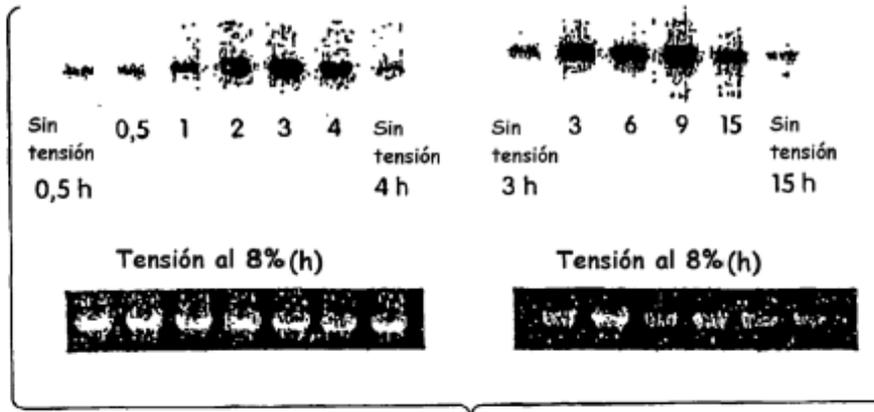


Fig. 8

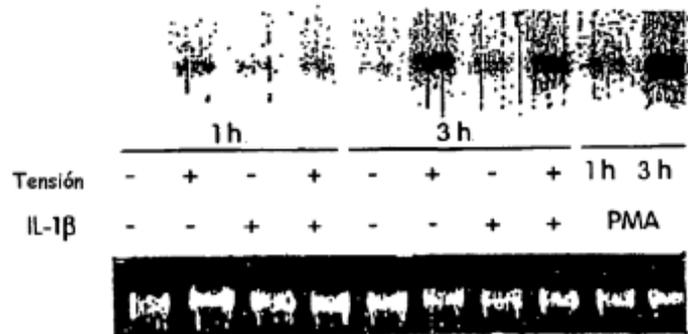


Fig. 9



Fig. 10

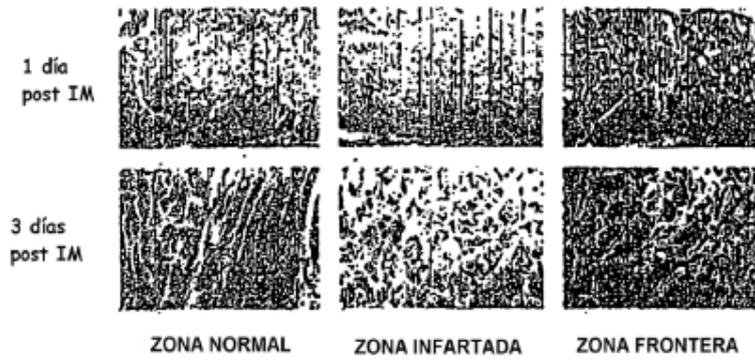


Fig. 11

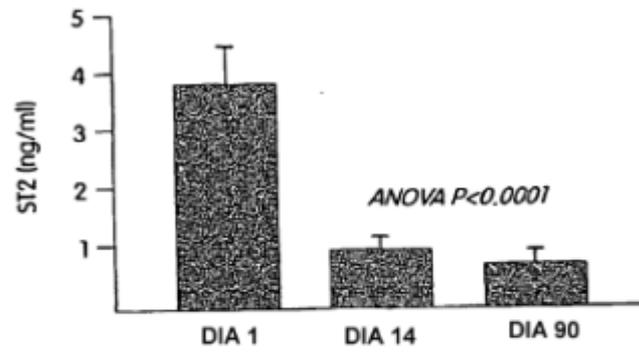


Fig. 12A

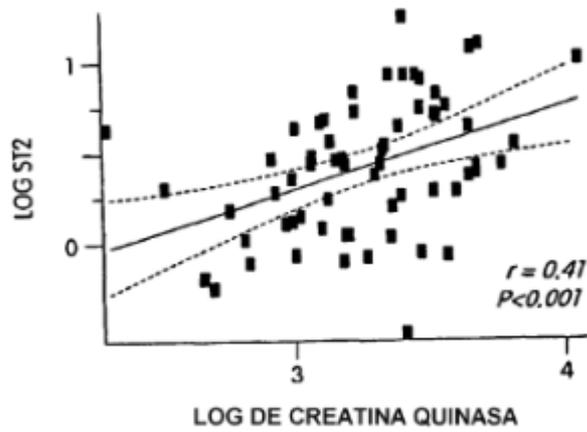


Fig. 12B

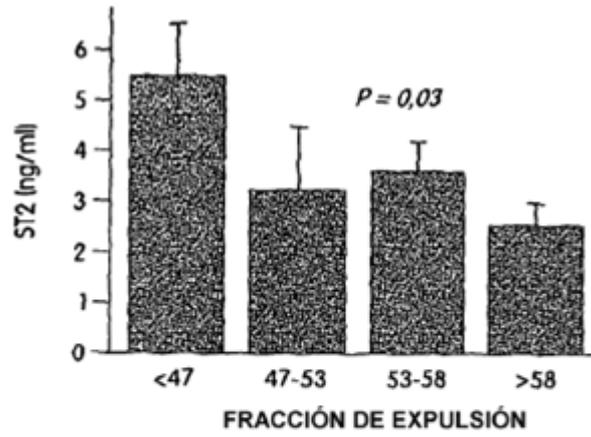


Fig. 12C

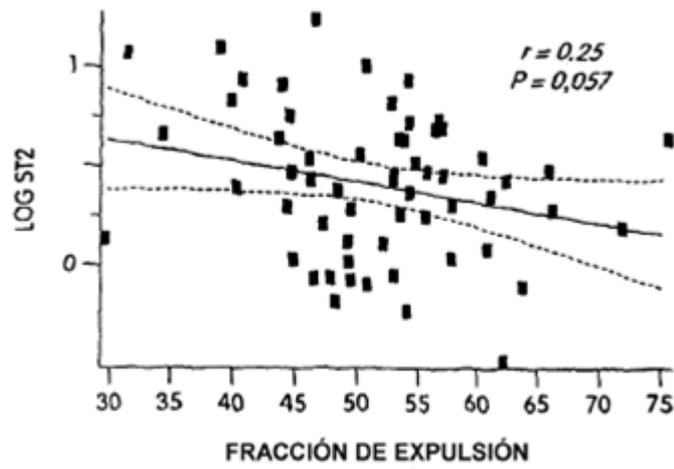


Fig. 12D

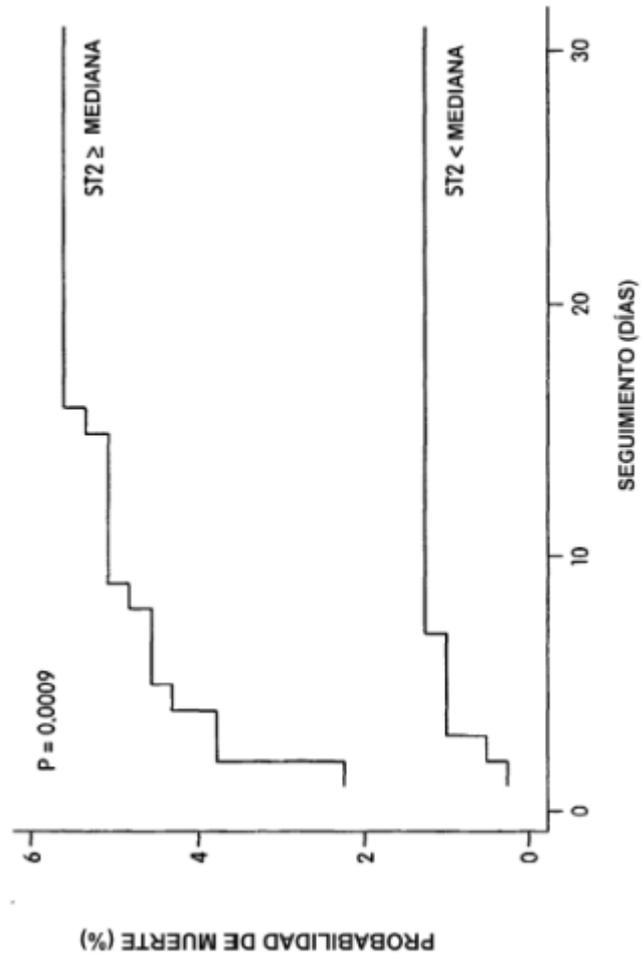


Fig. 13