

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 191**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**A61K 31/34** (2006.01)

**A61P 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2010 PCT/US2010/062023**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2011 WO11079273**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2010 E 10840169 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2515899**

54 Título: **Métodos y composiciones para enfermedades y afecciones cardiovasculares**

30 Prioridad:

**23.12.2009 US 289932 P**

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

**21.10.2016**

73 Titular/es:

**ARCA BIOPHARMA, INC. (100.0%)  
8001 Arista Place, Suite 200  
Broomfield, CO 80021, US**

72 Inventor/es:

**BRISTOW, MICHAEL, R. y  
PORT, J., DAVID**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 587 191 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

Métodos y composiciones para enfermedades y afecciones cardiovasculares

5 **Antecedentes de la invención****I. Campo de la invención**

10 Las realizaciones de la presente invención se dirigen por lo general a biología, genética molecular y medicina. Ciertas realizaciones se dirigen a métodos y composiciones que implican la identificación y/o tratamiento de un paciente que se podría beneficiar de terapia con un compuesto denominado S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato, que también se conoce como LA-419.

15 **II. Antecedentes**

La insuficiencia cardiaca, o enfermedad CV en fase terminal, afecta aproximadamente a cinco millones de americanos. Algunos estudios epidemiológicos indican una mayor prevalencia de factores de riesgo de insuficiencia cardiaca entre los individuos afroamericanos en Estados Unidos (Burt *et al.*, 1995). Recientes análisis de ensayos clínicos sobre insuficiencia cardiaca muestran que la tasa de mortalidad y la tasa de hospitalización para los individuos afroamericanos son significativamente más elevadas que para los individuos no afroamericanos.

20 La capa fina de células que recubre la superficie interior de los vasos sanguíneos se denomina endotelio. Esta capa modula el tono vascular a través de la liberación de óxido nítrico (NO), un potente vasodilatador que regula el flujo sanguíneo regional (Ignarro *et al.*, 1987; Rees *et al.*, 1989). Una reducción en la biodisponibilidad de NO contribuye a resistencia vascular elevada y pérdida de sensibilidad a los estímulos de la vasodilatación, las características de evidencia de hipertensión (Paniagua *et al.*, 2001; Panza *et al.*, 1990; Taddei *et al.*, 1993). Además, el NO presenta beneficios vasculares bien caracterizados tales como inhibición de la proliferación y migración de células del músculo liso, bloqueando la adhesión de leucocitos al endotelio y previniendo la agregación plaquetaria (Harrison, 1997). También se han investigado algunos agentes que estimulan directamente la liberación de NO para la prevención y 30 tratamiento de enfermedades y afecciones cardiovasculares (CV).

En Estados Unidos, los individuos afroamericanos muestran una mayor prevalencia de factores de riesgo CV, especialmente hipertensión (Burt *et al.*, 1995). Una teoría es que esto se puede atribuir a diferencias en la fisiología vascular, incluyendo reducción de la biodisponibilidad de NO. El apoyo para esto fue proporcionado por una 35 evaluación clínica de la actividad de la arteria braquial que demostró una reducción de la respuesta de los vasos de conductancia de NO tanto endógeno como exógeno en individuos afroamericanos sanos, en comparación con individuos blancos de la misma edad (Campia *et al.*, 2002). Como una explicación de esto, se informó de que hay una baja biodisponibilidad de NO desde el endotelio de los individuos afroamericanos, a pesar de niveles mucho más elevados de NO sintasa dependiente del endotelio (eNOS) (Kalinowski *et al.*, 2004). La base celular de esta paradoja fue el hallazgo de que la generación excesiva de  $O_2^-$  por la NAD(P)H oxidasa y eNOS desacoplada daba como resultado la pérdida de NO funcional debido a su reactividad con  $O_2^-$ , dando como resultado la formación de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), un potente oxidante. Recientemente se ha demostrado que el nebivolol, a diferencia de otro 40 inhibidor de  $\beta_1$ -selectivo (atenolol), es capaz de reducir de forma eficaz el estrés nitroxidativo y restaurar la biodisponibilidad de NO en individuos afroamericanos (Mason *et al.*, 2005).

45 El BiDil es un fármaco para insuficiencia cardiaca que se ha aprobado recientemente para tratamiento en individuos afroamericanos. Consiste en una combinación de dosis fija de dinitrato de isosorbida e hidralazina. El dinitrato de isosorbida es un donante de NO directo y su uso prolongado causa tolerancia. La hidralazina disminuye la presión arterial al relajar las células del músculo liso vascular. Esto puede ser causado por reducciones en los niveles de trifosfato de inositol, un segundo mensajero que estimula la liberación de calcio del retículo sarcoplasmático del 50 músculo liso.

El efecto vasodilatador de la hidralazina conduce a 1) disminución de la presión sanguínea arterial (diastólica más que 55 sistólica); 2) disminución de la resistencia vascular periférica; y 3) aumento del ritmo cardiaco, volumen de ictus y el gasto cardiaco. La hidralazina puede aumentar la actividad de la renina en plasma, supuestamente causada por el aumento de secreción de renina como respuesta a la liberación simpática refleja. Este aumento en la actividad de renina da como resultado la producción de angiotensina II, un estímulo para la aldosterona con la consiguiente reabsorción de sodio. La hidralazina también tiene una supuesta actividad antioxidante que puede contribuir a la reducción de la pérdida de NO.

60 Algunos nitratos tales como el dinitrato de isosorbida son donantes de NO directos que se relacionan con la activación de la guanilato ciclasa, un mediador de la vasodilatación de células del músculo liso. Se han usado ampliamente durante décadas en el tratamiento de angina de pecho e hipertensión, pero funcionan independientemente del endotelio. En la formulación del nitroprusiato sódico, el NO se coordina como un grupo nitrosilo que se une a hierro en un complejo bipiramidal cuadrado que se libera de forma espontánea a pH fisiológico. Una importante desventaja 65 asociada con amplio uso de los nitratos es la tolerancia, que conduce a un aumento de la producción de  $O_2^-$  vascular

(Münzel *et al.*, 1995). Por lo tanto, existe una necesidad de terapias que puedan mejorar los niveles de NO en la pared del vaso sin causar tolerancia y aumento del estrés oxidativo.

5 Se han descrito algunos derivados del mononitrato de isosorbida y su uso como agentes vasodilatadores con reducción de la tolerancia y, en particular, el uso de S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato (LA-419) en el tratamiento de trastornos cardiovasculares se ha descrito previamente (documento US 2003/225134 A1).

### Sumario de la invención

10 La presente invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. La presente divulgación también se refiere a los siguientes puntos.

- 15 1. El compuesto S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección cardiovascular, en el que una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto se administra al paciente después de haber sometido a ensayo al paciente y determinar que es homocigoto de tipo silvestre (G/G) en la posición 894 en el gen de la óxido nítrico sintasa (NOS3) endotelial.
- 20 2. El compuesto para su uso de acuerdo con el punto 1, en el que la enfermedad o afección cardiovascular es enfermedad arterial periférica, insuficiencia cardíaca, enfermedad cardíaca coronaria, espasmo coronario, infarto de miocardio, aterosclerosis o hipertensión arterial pulmonar.
- 25 3. El compuesto para su uso de acuerdo con el punto 1 o 2, en el que al menos una dosis de la composición se va a administrar al paciente, en el que la composición comprende aproximadamente 1-40 mg del compuesto, o en el que la composición comprende aproximadamente 5-20 mg del compuesto.
- 30 4. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de los puntos 1 a 3, en los que múltiples dosis de la composición se van a administrar al paciente.
- 35 5. El compuesto para su uso de acuerdo con el punto 4, en el que múltiples dosis de la composición en un periodo de 24 horas o en el que 1 a 3 dosis de la composición, en el que la composición comprende aproximadamente 1-40 mg del compuesto, se van a administrar al paciente.
- 40 6. El compuesto para su uso de acuerdo con el punto 1, en el que el paciente se ha sometido a ensayo para determinar el genotipo del paciente en la posición 894 en el gen de NOS3 después de haber proporcionado o suministrado una muestra biológica del paciente.
- 45 7. El compuesto para su uso de acuerdo con el punto 1, en el que el genotipo del paciente en la posición 894 en el gen de NOS3 se ha determinado después de haber pedido un ensayo.
- 50 8. S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato para su uso en el tratamiento de un paciente que se ha diagnosticado con una enfermedad o afección asociada con la producción de NO, en el que dicha enfermedad es un trastorno cardiovascular isquémico, glaucoma o un trastorno intestinal, en el que una cantidad eficaz de S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato se administra al paciente después de haber sometido a ensayo al paciente y determinar que es homocigoto de tipo silvestre (G/G) en la posición 894 en el gen de la óxido nítrico sintasa (NOS3) endotelial.
- 55 9. S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato para su uso en el aumento de los niveles de óxido nítrico (NO) en un paciente que se ha diagnosticado con una enfermedad o afección asociada con la producción de NO, en el que dicha enfermedad es un trastorno cardiovascular isquémico, glaucoma, o un trastorno intestinal, en el que una cantidad eficaz de dicho S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato se administra al paciente después de haber sometido a ensayo al paciente y determinar que es homocigoto de tipo silvestre (G/G) en la posición 894 en el gen de la óxido nítrico sintasa (NOS3) endotelial.
- 60 10. Un método *in vitro* para identificar un paciente adecuado para tratamiento con S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato que comprende determinar si el paciente es homocigoto de tipo silvestre (G/G) en la posición 894 en el gen de la óxido nítrico sintasa (NOS3) endotelial, en el que el paciente es adecuado para tratamiento con S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato si el paciente es homocigoto de tipo silvestre (G/G) en la posición 894 en el gen de NOS3.
- 65 11. Un método para diagnosticar un paciente como un candidato adecuado para tratamiento con S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato que comprende someter a ensayo una muestra del paciente para determinar si el paciente es homocigoto de tipo silvestre (G/G) en la posición 894 en el gen de la óxido nítrico sintasa (NOS3) endotelial e informar si el paciente es homocigoto de tipo silvestre (G/G) en la posición 894 en el gen de NOS3.

12. Uso de un kit para identificar un paciente adecuado para tratamiento con S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato o para diagnosticar un paciente como un candidato adecuado para tratamiento con S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato, en el que dicho kit comprende, en un envase adecuado, una sonda o al menos un conjunto de cebadores para identificar el polimorfismo de NOS3 en la posición 894.
13. El kit del punto 12, en el que la sonda comprende al menos un ácido nucleico con entre 15 y 100 nucleótidos de SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 3, en el que la sonda incluye el nucleótido en la posición 894 del gen de NOS3.
14. El kit del punto 12, en el que los cebadores comprenden al menos un conjunto de cebadores para amplificar una región de secuencia que incluye la posición 894 del gen de NOS3.

La capacidad para identificar con qué fármaco tratar a un paciente es fundamental para el tratamiento apropiado de ese paciente. La presente divulgación se refiere al diagnóstico y tratamiento de pacientes que tienen una enfermedad o afección cardiovascular. Se desvela que el tratamiento implica un fármaco donante de NO. Se desvela que el tratamiento implica a S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato (LA-419) o una sal, metabolito, o derivados del mismo. Se contempla que cualquier realización que implique a LA-419, también o como alternativa puede implicar a una sal o profármaco del mismo en otras realizaciones mencionadas en el presente documento.

Se desvelan métodos para tratar una enfermedad o afección cardiovascular en un paciente que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende el compuesto S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato. La presente divulgación se refiere a un paciente que se ha sometido a ensayo y se ha determinado que es de tipo silvestre homocigoto (G/G) en la posición 894 en el gen de la óxido nítrico sintasa (NOS3) endotelial. Se desvela que se puede administrar LA-419 a un paciente después de saber que el paciente es homocigoto de tipo silvestre (G/G) en la posición 894 del gen de NOS3.

También se desvelan métodos para tratar a un paciente con S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato después de que el paciente se haya sometido a ensayo y se haya determinado que es homocigoto de tipo silvestre (G/G) en la posición 894 en el gen de la óxido nítrico sintasa (NOS3) endotelial.

También se desvelan métodos para aumentar los niveles de óxido nítrico (NO) en un paciente que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato después de que el paciente se haya sometido a ensayo y se haya determinado que es homocigoto de tipo silvestre (G/G) en la posición 894 en el gen de la óxido nítrico sintasa (NOS3) endotelial.

También se desvelan métodos para evaluar si LA-419 es una terapia apropiada para un paciente que se ha diagnosticado con o tiene síntomas de una enfermedad o afección cardiovascular. Cualquier realización puede implicar la determinación de si el paciente es homocigoto de tipo silvestre en la posición 894 (G/G) en el gen de NOS3. Esta determinación puede implicar determinar directamente la secuencia mediante formación de genotipos del paciente basándose en un ensayo realizado en una muestra biológica que contiene ácidos nucleicos del paciente que determinan la secuencia en la posición 894 en ambos alelos. Esta formación de genotipos implica el análisis de los ácidos nucleicos en una muestra usando técnicas químicas bien conocidas por los expertos en la materia. En algunas realizaciones, la determinación es indirecta e implica, por ejemplo, la lectura de los resultados de un informe o una base de datos que revela que la secuencia en esa posición está en ambos alelos (ya sea mediante informe de que el paciente es homocigoto para un resto — por ejemplo, G/G o T/T — o que el paciente es heterocigoto en ese resto).

Se desvelan métodos para predecir la eficacia de LA-419 en un paciente con una enfermedad o afección cardiovascular o con síntomas de la misma. También se desvelan métodos para diagnosticar un paciente como un candidato adecuado para tratamiento con S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato que comprende someter a ensayo una muestra del paciente para determinar si el paciente es homocigoto de tipo silvestre (G/G) en la posición 894 en el gen de la óxido nítrico sintasa (NOS3) endotelial e informar si el paciente es homocigoto de tipo silvestre (G/G) en la posición 894 en el gen de NOS3.

La enfermedad o afección cardiovascular puede ser un trastorno cardiovascular isquémico crónico. La enfermedad o afección cardiovascular también puede ser enfermedad arterial periférica, insuficiencia cardiaca, enfermedad cardiaca coronaria, espasmo coronario, infarto de miocardio, aterosclerosis o hipertensión arterial pulmonar.

Se desvela que la administración de una cantidad eficaz de LA-419 al paciente se puede realizar de modo que el paciente pueda conseguir un beneficio terapéutico de LA-419. Se desvela que la cantidad de LA-419 administrada a un paciente es suficiente para proporcionar un nivel en suero de un metabolito de LA-419 de, como máximo, al menos o aproximadamente, 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 ng/ml y/o mg/ml, o cualquier intervalo derivable en el mismo.

65

- Se desvela que, en algunos métodos, al paciente se le administra al menos una dosis de la composición. La dosis en la composición puede incluir aproximadamente 1-40 mg de LA-419. Se desvela que al paciente se le puede administrar al menos una dosis de la composición, en el que la composición comprende aproximadamente 5-20 mg del compuesto. Al paciente se le pueden administrar múltiples dosis de la composición. Se contempla que al paciente se le pueden administrar múltiples dosis de la composición en un periodo de 24 horas. Algunas realizaciones pueden implicar a un paciente al que se le administran 1, 2, 3 o 4 dosis de la composición, en las que la composición comprende aproximadamente 1-40 mg del compuesto. Se desvela que estas dosis se pueden administrar en un periodo de 24 horas o en un día. El donante de NO, tal como LA-419, se puede administrar a una dosis de aproximadamente, al menos aproximadamente, o como máximo aproximadamente 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11,12, 13, 14, 15, 16,17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 o 150 mg o mg/kg incluyendo todos los valores e intervalos entre los mismos. También se desvela que LA 419 o un donante de NO se puede administrar 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más veces al día, a la semana o al mes, incluyendo todos los valores e intervalos entre los mismos. Como alternativa, el fármaco se puede administrar según sea necesario basándose en los síntomas del paciente.
- Se desvela que un metabolito de LA-419 se puede administrar al paciente. Se desvela que la cantidad de metabolito de LA-419 es la misma que la dosificación y régimen para LA- 419. Se desvela que la dosificación puede ser 0,5x, 1,5x, 2x, 2,5x, 3x, 4x o más superior a la dosificación de LA-419.
- Se desvela la obtención, provisión o suministro de una muestra biológica del paciente para someter a ensayo la determinación del genotipo del paciente en la posición 894 en el gen NOS3. Una muestra biológica puede ser una muestra de sangre, un frotis bucal, una muestra de tejido o un cultivo primario de células somáticas del paciente. En ciertos aspectos el análisis de la muestra comprende la realización de secuenciación de ácido nucleico, digestión de restricción, amplificación de ácido nucleico específica de alelo, análisis de polimorfismo conformacional monocatenario o análisis de hibridación específica de alelo. Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender adicionalmente la preparación de un informe que contenga información con respecto al genotipo de uno o más genes de NOS3 del paciente. En un aspecto más, se determina que el paciente es homocigoto de tipo silvestre en la posición 894 en el gen de NOS3 y posteriormente se trata con LA-419. Se puede determinar que el paciente es heterocigoto u homocigoto T/T en la posición 894 del gen de NOS3. También se desvela que un paciente no se trata con LA-4-19 y se puede tratar con un donante de NO alternativo.
- En algunos métodos, se desvela una etapa para solicitar un ensayo que determine el genotipo del paciente en la posición 894 en el gen de NOS3. También se desvela que los resultados del ensayo se pueden obtener o proporcionar a un profesional médico, tal como uno que se considera tratamiento con LA-419 para un paciente.
- La presente divulgación también se refiere a pacientes que se han diagnosticado con una enfermedad o afección asociada con la producción de NO. También se desvela que un paciente se ha diagnosticado con una enfermedad o afección cardiovascular y/o el paciente presenta uno o más síntomas de una enfermedad o afección cardiovascular. La enfermedad puede ser un trastorno cardiovascular isquémico, glaucoma o un trastorno intestinal.
- Se desvela que la secuencia de ácidos nucleicos se puede determinar usando amplificación de ácido nucleico, hibridación de ácido nucleico, análisis de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP), análisis de polimorfismo conformacional monocatenario (SSCP), secuenciación de ácido nucleico, cromatografía líquida de alto rendimiento desnaturizante, hibridación comparativa del genoma y/o transferencia de Southern. En ciertos aspectos, la amplificación de ácido nucleico comprende amplificación por reacción en cadena de polimerasa o amplificación por reacción en cadena de ligasa. En un aspecto más, el método de detección de hibridación de ácido nucleico comprende una sonda de oligonucleótido específica de alelo o una micromatriz de sondas de ácido nucleico.
- Se desvela una secuencia de ácidos nucleicos aislada que comprende 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95; 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o más nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, incluyendo todos los valores e intervalos entre los mismos.
- Se desvela un par cebador amplificador que comprende dos oligonucleótidos que amplifican un segmento de ácido nucleico que comprende el nucleótido 894 del gen NOS3 humano, tal como en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, o un ácido nucleico que es idéntico en un 85, 90, 95, 98 o 100 % con la SEQ ID NO: 1 o 3. Un cebador puede comprender toda o parte de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, o cualquiera de 5-10. Por ejemplo, un primer cebador puede comprender la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 5. Un segundo cebador puede comprender la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 6.
- Se desvela una sonda de ácido nucleico que se hibrida de forma específica a un ácido nucleico de NOS3 que comprende el nucleótido 894 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 o un ácido nucleico que es idéntico en al menos, o como máximo en un 85, 90, 95, 98 o 100 % (o cualquier intervalo derivable de los mismos) a una o ambas secuencias. La sonda de ácido nucleico puede estar etiquetada. En un aspecto más, la sonda de ácido nucleico es detectable

después de unión o hibridación a un ácido nucleico de NOS3 que comprende cualquiera del genotipo homocigoto de tipo silvestre o un genotipo que no es homocigoto de tipo silvestre en la posición 894 del gen de NOS3.

5 También se desvela un kit para formar genotipos de un gen de NOS3 que comprende oligonucleótidos de al menos 10 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 que amplifican un segmento de ácido nucleico que comprende el polimorfismo en la posición 894 o secuencia de tipo silvestre en la posición 894, o una sonda de ácido nucleico que se indica de forma específica con un gen de NOS3 que comprende la secuencia que no es de tipo silvestre en la posición 894.

10 Para conseguir estos métodos, un doctor, experto en medicina, o su equipo puede obtener una muestra biológica para evaluación. La muestra la puede analizar el experto o su equipo, o se puede enviar a un laboratorio externo o independiente. El experto en medicina puede ser consciente de si el ensayo está proporcionando información con respecto a los genes de NOS3 del paciente, o el experto en medicina puede ser consciente solamente de que el ensayo indica directa o indirectamente que el genotipo del paciente refleja la secuencia homocigota de tipo silvestre en los genes de NOS3 (homocigotos para la secuencia de tipo silvestre).

15 De forma análoga, el experto en medicina puede ser consciente de si el ensayo está proporcionando información con respecto a los genes de NOS3 del paciente o el experto en medicina puede ser consciente solamente de que el ensayo indica directa o indirectamente que el genotipo del paciente refleja la secuencia homocigota de tipo silvestre (G/G), alelos heterocigotos (G/T o T/G), o los alelos homocigotos que no son de tipo silvestre (T/T).

20 En cualquiera de estas circunstancias, el experto en medicina "conoce" o identifica indirectamente la información relevante que le permitirá a él o ella determinar si un donante de NO, tal como LA- 419, es un tratamiento médico apropiado. Por ejemplo, se contempla que un laboratorio realiza el ensayo para determinar ese genotipo del paciente de modo que su personal también conoce la información apropiada. Estos pueden informar al médico del resultado específico del ensayo realizado o el laboratorio puede simplemente informar de que LA-419 es un fármaco apropiado basándose en los resultados del laboratorio. Además, a través de estos canales diferentes, se puede conocer el genotipo del paciente en la posición 894 de uno o ambos genes de NOS3.

25 También se desvela un medio de lectura en ordenador, tangible, que comprende un genotipo de un sujeto, en el que el genotipo presenta la secuencia en la posición 894 en uno o ambos alelos del gen de NOS3. Se desvela que el medio que comprende el genotipo del sujeto exhibe la presencia de la secuencia de tipo silvestre en la posición 894 de uno o más genes de NOS3.

30 Se desvelan kits para determinar la secuencia de nucleótidos ya sea directa o indirectamente. Algunas realizaciones para determinar directamente la secuencia de nucleótidos pueden implicar un kit en un envase adecuado que comprende una sonda o al menos un conjunto de cebadores para identificar el polimorfismo de NOS3 en la posición 894. La sonda puede comprender al menos un ácido nucleico de entre 15 y 100 nucleótidos de SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 3, en el que la sonda incluye el nucleótido en la posición 894 del gen de NOS3. Se desvelan kits para relacionar cebadores que comprenden al menos un conjunto de cebadores para amplificar una región de secuencia que incluye la posición 894 del gen de NOS3. Algunos métodos indirectos pueden implicar la búsqueda en una base de datos para determinar la secuencia o para evaluar una secuencia de proteínas de la proteína codificada por los alelos de NOS3 del paciente.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "insuficiencia cardiaca" se usa ampliamente para hacer referencia a cualquier afección que reduzca la capacidad del corazón para bombear sangre. Como resultado, se desarrollan congestión y edema en los tejidos. Más frecuentemente, la insuficiencia cardiaca está causada por la disminución de la capacidad de contracción del miocardio, dando como resultado una reducción del flujo sanguíneo coronario; sin embargo, otros muchos factores pueden dar como resultado insuficiencia cardiaca, incluyendo daño a las válvulas cardiacas, deficiencia de vitaminas y enfermedad muscular cardiaca primaria. Aunque los mecanismos fisiológicos precisos de la insuficiencia cardiaca no se entienden completamente, por lo general se cree que la insuficiencia cardiaca está relacionada con trastornos en varias propiedades autonómicas cardiacas, incluyendo respuestas simpáticas, parasimpáticas y barorreceptoras. La expresión "manifestaciones de insuficiencia cardiaca" se usa ampliamente para incluir todas las escuelas asociadas con la insuficiencia cardiaca, tales como dificultad para respirar, edema con fóvea, un hígado sensible y agrandado, venas del cuello hinchadas, tasas pulmonares y similares incluyendo hallazgos de laboratorio asociados con la insuficiencia cardiaca.

40 El término "tratamiento" o equivalentes incluye la mejora y/o inversión de los síntomas de insuficiencia cardiaca (es decir, la capacidad del corazón para bombear sangre). La "mejora en la función fisiológica" del corazón se puede evaluar usando cualquiera de las medidas descritas en el presente documento (por ejemplo, medida de la fracción de eyección, acortamiento fraccional, dimensión interna del ventrículo izquierdo, ritmo cardiaco, etc.), así como cualquier efecto con respecto a la supervivencia del sujeto.

45 La expresión "cardiomiopatía dilatada" se refiere a un tipo de insuficiencia cardiaca caracterizada por la presencia de un ventrículo izquierdo dilatado de forma simétrica con una escasa función de contracción sistólica y, además, implica frecuentemente al ventrículo derecho.

Como se usa en el presente documento, la expresión "hipertrofia cardiaca" se refiere al proceso en el que los miocitos cardiacos adultos responden al estrés a través de crecimiento hipertrófico. Un crecimiento de este tipo se caracteriza por aumentos del tamaño de las células sin división celular, ensamblaje de sarcómeros adicionales dentro de la célula para intentar el aumento de generación de fuerza, y una activación de un programa de genes cardiacos fetales que reduce de forma inherente la función del miocardio. A menudo, la hipertrofia cardiaca se asocia con el aumento del riesgo de morbilidad y mortalidad, y por lo tanto algunos estudios dirigidos a la comprensión de los mecanismos moleculares de la hipertrofia cardiaca podrían tener un impacto significativo en la salud humana.

Como se usa en el presente documento, el término "genotipo" se refiere a la composición genética real de un organismo, mientras que "fenotipo" se refiere a los rasgos físicos presentados por un individuo (capacidad de respuesta a LA-419 para el tratamiento de una enfermedad o afección cardiovascular isquémica crónica).

Otras realizaciones se discuten a lo largo de la presente solicitud. Cualquier realización analizada con respecto a un aspecto de la invención también se aplica a otros aspectos de la invención y viceversa. Se entiende que las realizaciones en la sección de Ejemplos son realizaciones de la invención que se pueden aplicar a todos los aspectos de la invención.

Las expresiones "que inhibe", "que reduce" o "prevención", o cualquier variación de estas expresiones, cuando se usan en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva incluyen cualquier disminución mensurable o inhibición completa para conseguir un resultado deseado.

El uso del término "un" o "uno", cuando se usa en conjunto con la expresión "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva, puede hacer referencia a "uno", pero también es coherente con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno".

Se contempla que cualquier realización analizada en el presente documento se puede poner en práctica con respecto a cualquier método o composición de la invención, y viceversa. Además, algunas composiciones y kits de la invención se pueden usar para conseguir métodos de la invención.

A lo largo de la presente solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la desviación típica de error para el dispositivo o método que se está usando para determinar el valor.

El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para hacer referencia a "y/o" a menos que de forma explícita se indique que hace referencia solamente a alternativas o las alternativas son mutuamente exclusivas, aunque la divulgación apoya una definición que se refiere solamente a alternativas en "y/o". También se contempla que cualquier elemento enumerado usando el término "o" se puede excluir también de forma específica.

Como se usa en la presente memoria descriptiva y en la reivindicación o reivindicaciones, las expresiones "que comprende" (y cualquier forma de que comprende, tal como "comprender" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma de que tiene, tal como "tener" y "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma de que incluye, tal como "incluye" e "incluir") o "que contiene" (y cualquier forma de que contiene, tal como "contiene" y "contener") son inclusivas o sin límites y no excluye elementos o etapas del método sin mencionar, adicionales.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención llegarán a ser evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

### Descripción de las figuras

Las siguientes figuras forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención se puede comprender mejor por referencia a una o más de estas figuras en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

**FIG. 1.** Diagrama esquemático de un nanosensor de NO colocado a corta distancia de la superficie de una célula endotelial individual. El nanosensor mide los niveles de NO, O<sub>2</sub>, y ONOO<sup>-</sup> del endotelio intacto en tiempo real. Los sensores se forman depositando un material de detección en la punta de fibra de carbono con un diámetro de aproximadamente 0,5 μm. Las fibras se sellan con epoxi no conductor y se conectan eléctricamente a cables (oro, cobre) con epoxi de plata conductor.

**FIG 2.** Efectos comparativos de LA-419 e ISDN en la liberación de NO de células HUVEC aisladas de donantes de raza blanca no hispanos. Las células se incubaron con LA-419 o ISDN, cada uno a 500 nM, durante 12 horas antes de estimulación con Cal (1,0 μM). Los valores se informan como media ± D.T. (N = 5). \**p* < 0,05 con respecto al control (ensayo de comparaciones múltiples de Dunnett; ANOVA global: *p* = 0,0015; *F* = 10,326); †*p* = 0,0129 con respecto a tratamiento con LA-419 (Ensayo de *t* de Student).

**FIG. 3.** Efectos comparativos de LA-419 e ISDN en la liberación de ONOO<sup>-</sup> de células HUVEC aisladas de donantes de raza blanca no hispanos. Las células se incubaron con LA-419 o ISDN, cada uno a 500 nM, durante 12 horas antes de estimulación con Cal (1,0 μM). Los valores se informan como media ± D.T. (N = 5). \**p* < 0,01 con respecto al control (ensayo de comparaciones múltiples de Dunnett; ANOVA global: *p* < 0,0001; F = 34,909). Análisis de ensayo de t de Student de tratamiento con dinitrato de isosorbida con respecto a LA-419: *p* = 0,0995.

**FIG. 4.** Efectos comparativos de LA-419 e ISDN en la proporción de liberación de NO/ONOO<sup>-</sup> de células HUVEC aisladas de donantes de raza blanca no hispanos. Las células se incubaron con LA-419 o ISDN, cada uno a 500 nM, durante 12 horas antes de estimulación con Cal (1,0 μM). Los valores se informan como media ± D.T. (N = 5). \**p* < 0,01 con respecto al control (ensayo de comparaciones múltiples de Dunnett; ANOVA global: *p* < 0,0001; F = 20,154); †*p* = 0,0024 con respecto al tratamiento con LA-419 (Ensayo de t de Student).

**FIG. 5.** Efectos comparativos de LA-419 e ISDN en liberación de NO de células HUVEC aisladas de donantes afroamericanos. Las células se incubaron con LA-419 o ISDN, cada uno a 500 nM, durante 12 horas antes de estimulación con Cal (1,0 μM). Los valores se informan como media ± D.T. (N = 5). \**p* < 0,01 con respecto al control (ensayo de comparaciones múltiples de Dunnett; ANOVA global: *p* = 0,0036; F = 8,361); †*p* = 0,0252 con respecto al tratamiento con LA-419 (Ensayo de t de Student).

**FIG. 6.** Efectos comparativos de LA-419 e ISDN en liberación de ONOO<sup>-</sup> de células HUVEC aisladas de donantes afroamericanos. Las células se incubaron con LA-419 o ISDN, cada uno a 500 nM, durante 12 horas antes de estimulación con Cal (1,0 μM). Los valores se informan como media ± D.T. (N = 5). \**p* < 0,01 con respecto al control (ensayo de comparaciones múltiples de Dunnett; ANOVA global: *p* < 0,0001; F = 21,422). Análisis de ensayo de t de Student de tratamiento con dinitrato de isosorbida con respecto a LA-419: *p* = 0,4034.

**FIG. 7.** Efectos comparativos de LA-419 e ISDN en la proporción de liberación de NO/ONOO<sup>-</sup> de células HUVEC aisladas de donantes afroamericanos. Las células se incubaron con LA-419 o ISDN, cada uno a 500 nM, durante 12 horas antes de estimulación con Cal (1,0 μM). Los valores se informan como media ± D.T. (N = 5). \**p* < 0,01 con respecto al control (ensayo de comparaciones múltiples de Dunnett; ANOVA global: *p* = 0,0001; F = 17,921); †*p* = 0,0476 con respecto al tratamiento con LA-419 (Ensayo de t de Student).

### Descripción detallada de la invención

El tratamiento con fármacos que actúan como donantes de NO está extendido. Sin embargo, su eficacia es limitada debido a la tolerancia que inducen en los pacientes. De forma ideal, un fármaco que no indujera la tolerancia observada en la actualidad se podría usar para tratar pacientes con necesidad de los efectos del óxido nítrico. Como se muestra a continuación, se demuestra que el S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato (LA-419) tiene estas propiedades ideales. Las composiciones y métodos descritos en el presente documento implican el tratamiento de los pacientes con LA-419, en particular, los pacientes cuyo genotipo es homocigoto de tipo silvestre (G/G) en la posición 894 en el gen de la óxido nítrico sintasa endotelial, NOS3.

La presente invención por lo general se refiere a la determinación de un polimorfismo de NOS3 en un individuo y a la determinación de la capacidad de respuesta del paciente al tratamiento con LA-419. Se desvela que la eficacia de LA-419 se puede predecir basándose en el genotipo del paciente. De forma específica, se desvela la determinación del genotipo para un individuo en el gen de NOS3 (por ejemplo, determinar si el sujeto es homocigoto de tipo silvestre en la posición 894).

La farmacogenómica permite que un profesional clínico o médico dirija tratamientos profilácticos o terapéuticos a individuos que se beneficiarán en la mayor medida del tratamiento y evitar el tratamiento de los individuos que experimenten efectos secundarios sintomáticos. Por lo tanto, un profesional médico o clínico puede considerar la aplicación del conocimiento obtenido en el análisis farmacogenómico relevante en la determinación de si administrar LA-419 así como modificar la dosificación, el régimen y/o cantidades terapéuticamente eficaces a administrar para conseguir el efecto deseado con el tratamiento. Se desvela que un profesional médico o clínico puede alterar el tratamiento del sujeto por adición de una terapia adicional o mediante el uso de una terapia alternativa al tratamiento con LA-419.

### I. TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES Y AFECCIONES CARDIOVASCULARES

El tratamiento de enfermedades y afecciones cardiovasculares, que por lo general se entiende que hacen referencia a enfermedades, afecciones o trastornos que implican al corazón o los vasos sanguíneos, incluye una diversidad de opciones, tales como estatinas, diuréticos, anticoagulantes, beta bloqueadores, vasodilatadores, inhibidores de ACE o bloqueadores de canales de calcio. Los vasodilatadores causan una relajación del músculo liso que rodea a un vaso sanguíneo. Se consigue principalmente reduciendo la concentración del calcio intracelular o mediante la desfosforilación de miosina. Una forma para conseguir la vasodilatación es inducir óxido nítrico.

**A. Donantes de NO**

El BiDil es un fármaco relativamente nuevo que se ha aprobado recientemente para el tratamiento de insuficiencia cardiaca en individuos afroamericanos. El BiDil consiste en una combinación de dosis fija de dinitrato de isosorbida (vasodilatador) e hidralazina (antihipertensivo). La insuficiencia cardiaca, o enfermedad cardiovascular en fase terminal, afecta aproximadamente a cinco millones de americanos. Algunos estudios epidemiológicos indican una prevalencia más elevada de factores de riesgo para insuficiencia cardiaca entre individuos afroamericanos en Estados Unidos (Burt *et al.* 1995). Las complicaciones asociadas con estas enfermedades, tales como ictus, insuficiencia cardiaca y renal, contribuyen a tasas más elevadas de mortalidad en esta población. Algunos análisis recientes de ensayos clínicos de insuficiencia cardiaca muestran que la tasa de mortalidad y la tasa de hospitalización para individuos afroamericanos son significativamente más elevadas que para los individuos no afroamericanos.

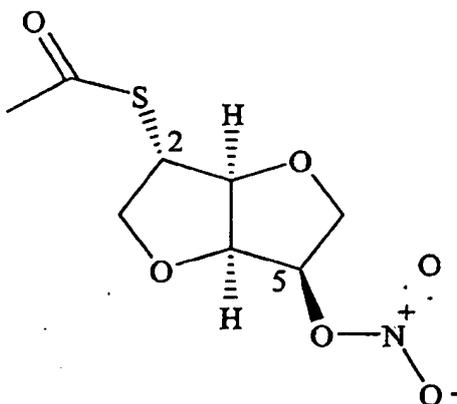
El dinitrato de isosorbida es un donante de NO directo y causar tolerancia con uso prolongado. La hidralazina es un diurético con una supuesta actividad antioxidante que puede contribuir a reducir la pérdida de NO a través de su reacción en niveles de superóxido. El fabricante (Nitromed) ha permitido reivindicar, en su marca aprobada, que el BiDil funciona a través de un aumento de la biodisponibilidad de NO en el vaso. Este mecanismo puede proporcionar ventajas preferentes para los pacientes afroamericanos con insuficiencia cardiaca que padecen de una deficiencia de NO más elevada que los individuos no afroamericanos.

El beneficio clínico de BiDil en individuos afroamericanos con insuficiencia cardiaca se sometió a ensayo en el ensayo de A-HeFT, un estudio controlado con placebo, con doble ocultación con 1.050 pacientes en 169 sitios en Estados Unidos. El ensayo se detuvo en julio de 2004 basándose en la recomendación del Data and Safety Monitoring Board independiente y el comité directivo para el ensayo debido a un beneficio de supervivencia significativo observado en los pacientes que ingerían el fármaco. Los resultados del ensayo con BiDil se presentaron en la reunión anual de la American Heart Association el 8 de noviembre de 2004. El ensayo inscribió un total de 1.050 pacientes afroamericanos que presentaban insuficiencia cardiaca de clase III o IV de la Nueva York Heart Association con ventrículos dilatados, constituyendo niveles moderadamente graves y graves de insuficiencia cardiaca. El criterio de valoración principal para el ensayo era la muerte por cualquier causa, hospitalización por insuficiencia cardiaca y cambio en la calidad de vida. El estudio de A-HeFT terminó pronto debido a una tasa de mortalidad significativamente más elevada en el grupo de placebo que en el grupo de tratamiento. Una tasa de mortalidad de un 10,2 por ciento se mostró en el grupo de placebo en comparación con una tasa de mortalidad de un 6,2 por ciento en el grupo de BiDil,  $p = 0,02$ . La puntuación media del compuesto para el criterio de valoración principal era significativamente mejor en el grupo al que se le administraba BiDil que en el grupo del placebo,  $p = 0,01$ , como fueron sus componentes individuales: una reducción de un 43 por ciento en la tasa de mortalidad por cualquier causa,  $p = 0,01$ ; una reducción relativa de un 33 por ciento en la tasa de primera hospitalización por insuficiencia cardiaca,  $p = 0,0001$ ; y una mejora estadísticamente significativa de la calidad de vida,  $p = 0,02$ , medido con el cuestionario de Minnesota Living with Heart Failure. Algunos sucesos adversos informados en el ensayo incluían síntomas de dolor de cabeza y mareos, que eran significativamente más frecuentes en el grupo al que se le administraba BiDil, y agravamientos de la insuficiencia cardiaca congestiva (tanto moderada como grave), que eran significativamente más frecuentes en el grupo de placebo.

Otros fármacos de los que se ha informado que tienen actividad donante de NO incluyen: GEA 3162; 1,1-dietil-2-hidroxi-2-nitrosohidralazina; dietilentriamina; Molsidomina; isosorbida-5-mononitrato; S-Nitrosotioles; aducto de óxido nítrico de dietilamina; S-nitrosomercaptoetanol; 3-morfolino-sidnonimina; S-nitrosocisteína; complejo de espermina y óxido nítrico; NOC 18; 2,2'-(hidroxinitrosohidrazono)bis-etanamina; S-Nitroso-N-Acetilpenicilamina; S-Nitrosoglutatión; S-nitro-N-acetilpenicilamina; PAPA NONOato; 3-(2-hidroxi-1-metil-2-nitrosohidrazino)-N-metil-1-propanamina; Nitroprusiato; Dinitrato de Isosorbida; FK 409.

**B. LA-419**

El fármaco S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato, que también se conoce como LA-419, es un donante de óxido nítrico que en la actualidad está en ensayos clínicos como un tratamiento para trastornos cardiovasculares. También se ha informado de que es una terapia candidata para el tratamiento de glaucoma y trastornos intestinales (Megson *et al.*, 2009). LA-419 tiene la siguiente estructura química:



## II. DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS

5 El polimorfismo descrito en el presente documento está presente en la posición 894 en el gen de NOS3. La presencia del polimorfismo se puede determinar a partir de la secuencia del gen o mediante el uso de características específicas del polimorfismo, por ejemplo, sitio de reconocimiento de enzima de restricción. Como resultado, se puede usar una diversidad de metodologías diferentes con el fin de detectar polimorfismos en el gen de NOS3. Como alternativa, el producto genético de proteína se puede evaluar para determinar el genotipo del paciente.

10

### A. Ácidos Nucleicos

La presente divulgación se refiere a diversos ácidos nucleicos, incluyendo cebadores de amplificación, sondas de oligonucleótido y otros elementos de ácido nucleico implicados en el análisis del ADN genómico. En ciertos aspectos, un ácido nucleico comprende un ácido nucleico de tipo silvestre, de tipo mutante o polimórfico.

15

El término polimorfismo de "NOS3" se refiere a un polimorfismo en el gen de NOS3. Una secuencia de tipo silvestre de la región codificante de NOS3 se proporciona como SEQ ID NO: 1; esta secuencia tiene una G en la posición 894. La secuencia del NOS3 con un polimorfismo en la posición 894 (una T en lugar de una G) se muestra como SEQ ID NO: 3. El número de registro NM\_000603.4 en Genbank, que se incorpora por la presente por referencia, muestra una T en la posición 894. La posición 894 corresponde al número de nucleótido 1187 en la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3. Los inventores contemplan y los expertos en la materia entienden que un genotipo de un paciente puede incluir otros Polimorfismos además del polimorfismo en la posición 894 (1187 desde la primera posición de la secuencia de ADNc). Estas variaciones de secuencia se pueden acomodar en la medida en la que cebadores y sondas se diseñan para detectar la secuencia en la posición 894. Alguien con una experiencia habitual en la materia podría conocer cómo identificar estos polimorfismos, que se conocen fácilmente, por ejemplo, en la base de datos de NCBI con el número de registro de NOS3 en Internet en [ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?showRare=on&chooseRs=coding&locusId=4846&mrna=NM000603.3&ctg=NT\\_007914.14&prot=NP\\_000594.2&orien=forward&refresh=refresh](http://ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?showRare=on&chooseRs=coding&locusId=4846&mrna=NM000603.3&ctg=NT_007914.14&prot=NP_000594.2&orien=forward&refresh=refresh). Parece que los 43 SNP están identificados en la actualidad en NOS3.

30

La posición de un polimorfismo se puede diseñar basándose en el número total de nucleótidos en la secuencia partiendo como el nucleótido 1 (que coincide con el primer nucleótido que codifica el primer aminoácido) y progresando en incrementos de uno hasta el final de la secuencia, es decir, nucleótido 894 de la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3. La secuencia de polipéptidos codificada por la secuencia de 894 de tipo silvestre se muestra en la SEQ ID NO: 2; tiene una Glu en el aminoácido 298. La secuencia polimórfica de 894 que tiene una T codifica lo que se muestra en la SEQ ID NO: 4; tiene una Asp en el aminoácido 298.

35

Se desvela que algunos ácidos nucleicos usados en el presente documento pueden comprender o son complementarios con 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1100, 1165, 1200, 1300, 1400, 1500, 1840, 1870 o más nucleótidos contiguos, o cualquier intervalo derivable de los mismos, de la secuencia de NOS3 humana proporcionada en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, o cualquier otra secuencia proporcionada en el presente documento. Un experto en la materia sabe cómo diseñar y usar cebadores y sondas para hibridación y amplificación de una secuencia en el gen de NOS3. La secuencia puede ser la secuencia codificante de NOS3 (o su complemento) o se basa en la transcripción de NOS3, tal como un ADNc de esta secuencia.

45

50

Por lo general, estas definiciones hacen referencia a una molécula monocatenaria, pero en algunas realizaciones específicas también incluirá una hebra adicional que es parcial, sustancial o totalmente complementaria con la molécula monocatenaria. Por lo tanto, un ácido nucleico puede incluir una molécula bicatenaria o una molécula tricatenaria que comprende una o más hebras(s) complementarias o "complemento(s)" de una secuencia en particular que comprende una molécula. Como se usa en el presente documento, un ácido nucleico monocatenario se puede indicar con el sufijo "mc", un ácido nucleico bicatenario con el sufijo "bc", y un ácido nucleico tricatenario con el prefijo "tc."

### 1. Preparación de Ácidos Nucleicos

Un ácido nucleico se puede preparar con cualquier técnica conocida por un experto habitual en la materia, tal como por ejemplo, síntesis química, producción enzimática o producción biológica. Algunos ejemplos no limitantes de un ácido nucleico sintético (por ejemplo, un oligonucleótido sintético), incluyen un ácido nucleico preparado mediante síntesis química *in vitro* usando química de fosfotriéster, fosfito o fosforamidita y técnicas en fase sólida tales como las que se describen en el documento de Patente Europea 266.032, o a través de compuestos intermedios de desoxinucleósido H-fosfonato como lo describen Froehler *et al.*, 1986 y en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.705.629.

En los métodos de la presente invención, se puede usar uno o más oligonucleótidos. En ciertos aspectos, la amplificación de oligonucleótidos se puede diseñar en cualquier lado o solapándose con los límites del sitio de inserción. En un aspecto más, se puede diseñar un oligonucleótido específico para la secuencia en 894, ya sea una G o una T. Estos oligonucleótidos pueden tener una longitud que varía de 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 50, nucleótidos o más, incluyendo todos los valores e intervalos entre los mismos. Por ejemplo, se han desvelado diferentes mecanismos de síntesis de oligonucleótidos en los documentos de Patente de Estados Unidos 4.659.774, 4.816.571, 5.141.813, 5.264.566, 4.959.463, 5.428.148, 5.554.744, 5.574.146, 5.602.244.

Un ejemplo no limitante de un ácido nucleico producido por vía enzimática incluye uno producido por enzimas en reacciones de amplificación tales como PCR™ (véase por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.683.202 y el documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.682.195, o la síntesis de un oligonucleótido descrita en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.645.897, incorporados en el presente documento por referencia. Un ejemplo no limitante de un ácido nucleico producido por vía biológica incluye un ácido nucleico recombinante producido (es decir, replicado) en una célula viva, tal como un vector de ADN recombinante replicado en bacterias (véase por ejemplo, Sambrook *et al.* 2001).

### 2. Purificación de Ácidos Nucleicos

Un ácido nucleico se puede purificar en geles de poliacrilamida, gradientes de centrifugación con cloruro de cesio, columnas de cromatografía o mediante cualquier otro medio conocido por alguien con una experiencia habitual en la materia (véase por ejemplo, Sambrook *et al.*, 2001).

También se desvela un ácido nucleico que es un ácido nucleico aislado. Como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ARN y o ADN) que se ha aislado del, o de otro modo está libre del, volumen de los ácidos nucleicos genómicos y transcritos totales de una o más células. "Ácido nucleico aislado" puede hacer referencia a un ácido nucleico que se ha aislado del, o que de otro modo está libre del, volumen de componentes celulares o componentes de reacción *in vitro* tales como por ejemplo, macromoléculas tales como lípidos o proteínas, moléculas biológicas pequeñas, y similares.

### 3. Segmentos de Ácidos Nucleicos

El ácido nucleico puede ser un segmento de ácido nucleico. Como se usa en el presente documento, la expresión "segmento de ácido nucleico", son fragmentos de un ácido nucleico, tales como, para un ejemplo no limitante, los que codifican solamente parte de una secuencia de NOS3, o parte del locus del gen o secuencia genética de NOS3. Por lo tanto, un "segmento de ácido nucleico" puede comprender cualquier parte de una secuencia genética, que incluye de aproximadamente 2 nucleótidos al gen de longitud completa incluyendo regiones promotoras para la señal de poliadenilación y cualquier longitud que incluye toda la región codificante.

Diversos segmentos de ácido nucleico se pueden diseñar basándose en una secuencia de ácidos nucleicos en particular, y pueden ser de cualquier longitud. Al asignar valores numéricos a una secuencia, por ejemplo, el primer resto es 1, el segundo arresto es 2, etc., se puede crear un algoritmo que define todos los segmentos de ácidos nucleicos:

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

en el que n es un número entero de 1 al último número de las secuencias e y es la longitud del segmento de ácido nucleico menos uno, en el que n + y no supera el último número de la secuencia. Por lo tanto, para un 10-mero, los segmentos de ácido nucleico corresponden a las bases 1 a 10, 2 a 11, 3 a 12... y así sucesivamente. Para un 15-mero, los segmentos de ácido nucleico corresponden a las bases 1 a 15, 2 a 16, 3 a 17... y así sucesivamente. Para un

20-mero, los segmentos de ácido nucleico corresponden a las bases 1 a 20, 2 a 21, 3 a 22... y así sucesivamente. En ciertas realizaciones, el segmento de ácido nucleico puede ser una sonda o cebador. Como se usa en el presente documento, una "sonda" por lo general se refiere a un ácido nucleico usado en un método o composición de detección. Como se usa en el presente documento, un "cebador" por lo general se refiere a un ácido nucleico usado en un método o composición de extensión o amplificación.

#### 4. Complementos de ácido nucleico

También se desvela un ácido nucleico que es complementario a un ácido nucleico. Un ácido nucleico es "complemento(s)" o es "complementario" a otro ácido nucleico cuando es capaz de emparejar bases con otro ácido nucleico de acuerdo con las reglas convencionales de complementariedad de unión de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen inversa. Como se usa en el presente documento "otro ácido nucleico" puede hacer referencia a una molécula separada o una secuencia separada en el espacio de la misma molécula. En realizaciones preferentes, un complemento es una sonda de hibridación o cebador de amplificación para la detección de un polimorfismo de ácido nucleico.

Como se usa en el presente documento, el término "complementario" o "complemento" también se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleobases consecutivas o nucleobases semiconsecutivas (por ejemplo, uno o más restos de nucleobases no están presentes en la molécula) capaz de hibridarse con otra hebra o doble cadena de ácido nucleico incluso si menos de todas las bases de las nucleobases no se emparejan con una nucleobase homóloga. Sin embargo, en algunas realizaciones de diagnóstico o detección, se usan ácidos nucleicos completamente complementarios.

#### 5. Detección y Evaluación de Ácidos Nucleicos

La formación de genotipos se puede realizar usando métodos que se describen en Small *et al.* (2002). El experto en la materia entenderá que otras técnicas convencionales están disponibles para la formación de genotipos y cualquier técnica se puede usar como se describe en el presente documento. A continuación se proporcionan algunos métodos generales de detección de ácidos nucleicos.

Se desvela que la formación de genotipos implica aislar del paciente de una mezcla de ácidos nucleicos que comprende ambas copias del gen de NOS3, o un fragmento del mismo, y determinar la secuencia de nucleótidos en la posición 894 del gen de NOS3. Esto puede implicar determinar la secuencia basándose en las transcripciones producidas a partir de ambas copias del gen. Otros polimorfismos, tales como polimorfismos de un solo nucleótido se pueden unir a y son indicativos del polimorfismo en la posición 894 descrito en el presente documento. En consecuencia, en algunas realizaciones, se puede usar un polimorfismo en desequilibrio de unión (LED o LD) con el polimorfismo en la posición 894 para determinar la secuencia en la posición 894.

Los expertos en la materia observaran fácilmente que algunas moléculas de ácido nucleico pueden ser moléculas bicatenarias y que la referencia a un sitio en particular en una hebra se refiere, también, al sitio correspondiente en una hebra complementaria. Por lo tanto, en la definición de un sitio polimórfico, la referencia a una secuencia que incluye una adenina, una timina (uridina), una citosina, o una guanina en un sitio en particular en una hebra de una molécula de ácido nucleico también pretende incluir la timina (uridina), adenina, guanina o citosina (respectivamente) en el sitio correspondiente en una hebra complementaria de una molécula de ácido nucleico. Por lo tanto, se puede hacer referencia a cualquier hebra y aún comprende el mismo sitio polimórfico y se puede designar un oligonucleótido para hibridarse con cualquier hebra. A lo largo del texto, para identificar un sitio polimórfico, se hace referencia a la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 con fines de conveniencia.

Por lo general, la mezcla de ácido nucleico se aísla de una muestra biológica tomada del individuo, tal como una muestra de sangre o muestra de tejido usando técnicas convencionales tal como se desvela en Jones (1963) que se incorpora por la presente por referencia. Algunas muestras de tejido adecuadas incluyen sangre completa, semen, saliva, lágrimas, orina, materia fecal, sudor, materia bucal, piel y pelo. La mezcla de ácido nucleico puede estar formada por ADN genómico.

La capacidad para predecir una respuesta del paciente a LA-419 ayuda al médico que trata a tomar decisiones sobre cómo tratar a un paciente que tiene una enfermedad o afección cardiovascular. Un paciente cuyo genotipo indica una probabilidad de que el paciente responda bien a LA-419 (es decir, un paciente homocigoto de tipo silvestre en la posición 894 en el gen de NOS3) podría ser un candidato mejor para terapia, y el médico puede tratar al paciente con una forma de terapia alternativa.

En los métodos de formación de fenotipos usados en el presente documento, la identidad de un sitio polimórfico se puede determinar por amplificación de una región diana que contiene el sitio polimórfico directamente a partir de una o ambas copias del gen de NOS3 presentes en el individuo y la secuencia de la región o regiones amplificadas se puede determinar con métodos convencionales o evaluar directamente.

La(s) región(ones) diana se puede amplificar usando cualquier método de amplificación dirigida por oligonucleótido, que incluye, pero no se limita a, reacción en cadena de polimerasa (PCR) (documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.965.188), reacción en cadena de ligasa (LCR) (Barany *et al.*, 1991; documento WO90/01069), y ensayo de ligamiento de oligonucleótidos (OLA) (Landegren *et al.*, 1988). Algunos oligonucleótidos útiles como cebadores o sondas en métodos de este tipo se podrían hibridar de forma específica a una región del ácido nucleico que contiene o es adyacente al sitio polimórfico. Por lo general, los oligonucleótidos tienen una longitud entre 10 y 35 nucleótidos y preferentemente, una longitud entre 15 y 30 nucleótidos. Más preferentemente, los oligonucleótidos tienen una longitud de 20 a 25 nucleótidos. La longitud exacta del oligonucleótido dependerá de muchos factores que de forma rutinaria se consideran y se ponen en práctica por el experto en la materia.

Otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos conocidos se pueden usar para amplificar la región diana incluyendo sistemas de amplificación basados en transcripción (documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.130.238; documento EP 329.822; documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.169.766, documento WO89/06700) y métodos isotérmicos (Walker *et al.*, 1992).

Un polimorfismo en la región diana también se puede ensayar antes o después de amplificación usando uno o varios métodos basados en hibridación conocidos en la técnica. Por lo general, algunos oligonucleótidos específicos de alelo se usan en la realización de tales métodos. Los oligonucleótidos específicos de alelo se pueden usar como pares de sondas etiquetadas de forma diferente, con un miembro del par mostrando un emparejamiento perfecto con una variante de una secuencia diana y el otro miembro mostrando un emparejamiento perfecto con una variante diferente. Más de un sitio polimórfico se puede detectar de una vez usando un conjunto de oligonucleótidos o pares de oligonucleótidos específicos de alelo.

La hibridación de un oligonucleótido específico de alelo con un polinucleótido diana se puede realizar con ambas entidades en solución, o una hibridación de este tipo se puede realizar cuando cualquiera del oligonucleótido o el polinucleótido diana se fija de forma covalente o no covalente a un soporte sólido. La unión se puede mediar, por ejemplo, con interacciones de anticuerpo-antígeno, poli-L-Lys, estreptavidina o avidina-biotina, puentes salinos, interacciones hidrófobas, uniones químicas, reticulación y coacción por UV, etc. Algunos oligonucleótidos específicos de alelo se pueden sintetizar directamente en el soporte sólido o se pueden unir al soporte sólido después de la síntesis. Algunos soportes sólidos adecuados para su uso en métodos de detección de la invención incluyen sustratos hechos de silicio, vidrio, plástico, papel y similares, que se pueden formar, por ejemplo, en pocillos (como en placas de 96 pocillos), portaobjetos, láminas, membranas, fibras, chips, placas y perlas. El soporte sólido se puede tratar, revestir o derivatizar para facilitar la inmovilización del oligonucleótido específico de alelo o ácido nucleico diana.

El genotipo para uno o más sitios polimórficos en el gen de NOS3 u otros sitios en LD con la posición 894 de un individuo también se puede determinar por hibridación de una o ambas copias del gen, o un fragmento de las mismas, a matrices y submatrices de ácido nucleico y tal como se describe en el documento WO 95/11995. Las matrices podrían contener una batería de oligonucleótidos específicos de alelo que representan cada uno de los sitios polimórficos a incluir en el genotipo o haplotipo.

La identidad de los polimorfismos también se puede determinar usando una técnica de detección de falta de coincidencias, que incluye, pero no se limita a, el método de protección de RNasa usando ribosondas (Winter *et al.*, 1985; Meyers *et al.*, 1985) y proteínas que reconocen faltas de coincidencias de nucleótidos, tales como la proteína mutS de *E. coli* (Modrich, 1991). Como alternativa, algunos alelos variantes se pueden identificar mediante análisis de polimorfismo de conformación monocatenario (SSCP) (Orita *et al.*, 1989; Humphries *et al.*, 1996) o electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) (Wartell *et al.*, 1990; Sheffield *et al.*, 1989).

Un método de extensión de cebador mediado por polimerasa también se puede usar para identificar el polimorfismo(s). Varios métodos de este tipo se han descrito en la bibliografía de patentes y científica. Algunos cebadores ampliados que contienen un polimorfismo se pueden detectar mediante espectrometría de masas como se describe en el documento de patente de Estados Unidos n.º 5.605.798. Otro método de extensión de cebador es la PCR específica de alelo (Ruano *et al.*, 1989; Ruano *et al.*, 1991; documento WO 93/22456; Turki *et al.*, 1995).

La variación polimórfica en el gen de NOS3 humano también se puede detectar usando digestión diferencial de ADN con ciertas enzimas de restricción (Small *et al.*, 2002) o mediante cualquier otro método que identifique la secuencia de la posición polimórfica en el gen de NOS3.

#### **a. Hibridación**

El uso de una sonda o cebador con entre 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, preferentemente con una longitud entre 17 y 100 nucleótidos, o en algunos aspectos de la invención con una longitud de hasta 1-2 kilobases o superior, permite la formación de una molécula bicatenaria que es tanto estable como selectiva. Por lo general son preferentes algunas moléculas que tienen secuencias complementarias con respecto a tramos contiguos con una longitud de más de 20 bases, para aumentar la estabilidad y/o selectividad de las moléculas híbridas obtenidas. Por lo general, será preferente diseñar moléculas de ácido nucleico para hibridación que tengan una o más secuencias complementarias

con una longitud de 20 a 30 nucleótidos, o incluso más larga cuando se desee. Los fragmentos de este tipo se pueden preparar fácilmente, por ejemplo, mediante síntesis directa del fragmento por medios químicos o mediante introducción de secuencias seleccionadas en vectores recombinantes para producción recombinante.

5 Por consiguiente, las secuencias de nucleótidos como se desvela en el presente documento se pueden usar por su capacidad para formar de forma selectiva moléculas bicatenarias con tramos complementarios de ADN y/o ARN o para proporcionar cebadores para amplificación de ADN o ARN de muestras. Dependiendo de la aplicación prevista, se podría desear el uso de condiciones variables de hibridación para conseguir grados variables de selectividad de la sonda o cebadores para la secuencia diana.

10 Para aplicaciones que requieren una selectividad elevada, por lo general se deseará el uso de condiciones de rigurosidad relativamente elevada para formar los híbridos. Por ejemplo, condiciones de relativamente bajo contenido salino y/o de temperatura elevada, tales como las que se proporcionan con NaCl de aproximadamente 0,02 M a aproximadamente 0,10 M a temperaturas de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C. Tales condiciones de rigurosidad elevada toleran pocas, si las hubiera, faltas de coincidencias entre la sonda o cebadores y la hebra de molde o diana y podrían ser particularmente adecuadas para aislar genes específicos o para detectar un polimorfismo específico. Por lo general se observa que algunas condiciones se pueden hacer más rigurosas mediante la adición de cantidades crecientes de formamida. Por ejemplo, en condiciones altamente rigurosas, la hibridación a ADN unido a filtro se puede realizar en NaHPO<sub>4</sub> 0,5 M, dodecil sulfato sódico al 7 % (SDS), EDTA 1 mM a 65 °C, y lavando en 0,1 x SSC/SDS al 0,1 % a 68 °C (Ausubel *et al.*, 1989).

25 Algunas condiciones se pueden hacer menos rigurosas aumentando la concentración salina y/o disminuyendo la temperatura. Por ejemplo, una condición de rigurosidad media se podría proporcionar con NaCl de aproximadamente 0,1 a 0,25 M a temperaturas de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 55 °C, mientras que una condición de rigurosidad baja se podría proporcionar con sal de 0,15 M a aproximadamente 0,9 M, a temperaturas que varían de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 55 °C. En condiciones de baja rigurosidad, tales como condiciones moderadamente rigurosas, el lavado se puede realizar por ejemplo en 0,2 x SSC/SDS al 0,1% a 42 °C (Ausubel *et al.*, 1989). Algunas condiciones de hibridación se pueden manipular fácilmente dependiendo de los resultados deseados.

30 En otras realizaciones, la hibridación se puede conseguir en condiciones de, por ejemplo, Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, ditiotreitól 1,0 mM, a temperaturas entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 37 °C. Otras condiciones de hibridación usadas podrían incluir Tris-HCl aproximadamente 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, a temperaturas que varían de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 72 °C.

35 Se desvela que será ventajoso usar ácidos nucleicos de secuencias definidas de la presente invención en combinación con un medio apropiado, tal como una etiqueta, para determinar la hibridación. En la técnica se conoce una amplia diversidad de medios indicadores apropiados, incluyendo ligandos fluorescentes, radiactivos, enzimáticos o de otro tipo, tales como avidina/biotina, que son capaces de ser detectados. Se puede desear el uso de una etiqueta fluorescente o una etiqueta enzimática tal como ureasa, fosfatasa o peroxidasa alcalina, en lugar de reactivos radiactivos u otros reactivos ambientalmente no deseados. En el caso de etiquetas enzimáticas, se conocen sustratos indicadores colorimétricos que se pueden usar para proporcionar un medio de detección que se puede detectar de forma visible o de forma espectrofotométrica, para identificar una indicación específica con muestras que contienen ácidos nucleicos complementarios. En otros aspectos, puede estar presente un sitio de escisión de nucleasa en particular y la detección de una secuencia de nucleótidos en particular se puede determinar mediante la presencia o ausencia de escisión de ácido nucleico.

50 En general, se prevé que las sondas o cebadores descritos en el presente documento serán útiles como reactivos en la hibridación en solución, tal como en la PCR, para la detección de expresión o genotipo de los genes correspondientes, así como en realizaciones que usan una fase sólida. En realizaciones que implican una fase sólida, el ADN de ensayo (o ARN) se adsorbe o fija de otro modo a una matriz o superficie seleccionada. Este ácido nucleico monocatenario, fijado, se somete a continuación a hibridación con sondas seleccionadas en las condiciones deseadas. Las condiciones seleccionadas dependerán de las circunstancias en particular (que dependen, por ejemplo, del contenido de G + C, tipo de ácido nucleico diana, fuente de ácido nucleico, tamaño de sonda de hibridación, etc.). La optimización de las condiciones de hibridación para la aplicación de interés en particular es bien conocida por los expertos en la materia. Después de lavar las moléculas hibridadas para retirar moléculas sonda unidas de forma no específica, la hibridación se detecta y/o se cuantifica, determinando la cantidad de etiqueta unida. Algunos métodos de hibridación en fase sólida representativos se describen en los documentos de Patente de Estados Unidos n.ºs 5.843.663, 5.900.481 y 5.919.626. Otros métodos de hibridación que se pueden usar en la práctica de la presente invención se describen en los documentos de Patente de Estados Unidos n.ºs 5.849.481, 5.849.486 y 5.851.772.

## 60 **b. Amplificación de Ácidos Nucleicos**

Algunos ácidos nucleicos usados como molde para amplificación se pueden aislar a partir de células, tejidos u otras muestras de acuerdo con metodologías convencionales (Sambrook *et al.*, 2001). Se desvela que el análisis se puede realizar en homogeneizados de células o tejidos enteros o muestras de fluidos biológicos con o sin purificación sustancial del ácido nucleico molde. El ácido nucleico puede ser ADN genómico o ARN de células fraccionadas o

completas. Cuando se usa ARN, se puede desear convertir primero el ARN en un ADN complementario.

El término "cebador", como se usa en el presente documento, pretende incluir cualquier ácido nucleico que es capaz de cebar la síntesis de un ácido nucleico naciente en un proceso dependiente del molde. Por lo general, los cebadores son oligonucleótidos con una longitud de diez a veinte y/o treinta pares de bases, pero se pueden usar secuencias más largas. Los cebadores se pueden proporcionar en forma de bicatenaria y/o monocatenaria, aunque es preferente la forma monocatenaria.

Los pares de cebadores diseñados para hibridarse de forma selectiva con ácidos nucleicos correspondientes al locus del gen de NOS3, o variantes de los mismos, y fragmentos de los mismos se ponen en contacto con el ácido nucleico molde en condiciones que permiten la hibridación selectiva. Dependiendo de la aplicación deseada, se pueden seleccionar condiciones de hibridación de alta rigurosidad que solamente permitirán la hibridación con secuencias que son totalmente complementarias con los cebadores. Se desvela que la hibridación se puede producir en condiciones de rigurosidad reducida para permitir la amplificación de ácidos nucleicos que contienen una o más faltas de coincidencia con las secuencias cebadoras. Una vez hibridado, el complejo de molde-cebador se pone en contacto con una o más enzimas que facilitan la síntesis de ácidos nucleicos dependiente de molde. Se realizan múltiples rondas de amplificación, también conocidas como "ciclos", hasta que se produce una cantidad suficiente de producto de amplificación.

El producto de amplificación se puede detectar, analizar o cuantificar. En ciertas aplicaciones, la detección se puede realizar por medios visuales. En ciertas aplicaciones, la detección puede implicar la identificación indirecta del producto a través de quimioluminiscencia, gammagrafía radiactiva de radioetiqueta incorporada o etiqueta fluorescente o incluso a través de un sistema que usa señales de impulsos eléctricos y/o térmicos (tecnología Affymax; Bellus, 1994).

Un número de procesos dependientes de molde están disponibles para amplificar las secuencias de oligonucleótidos presentes en una muestra de molde dada. Uno de los métodos de amplificación más conocidos es la reacción en cadena de la polimerasa (denominada PCR™) que se describen con detalle en los documentos de Patente de Estados Unidos n.ºs 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159, y en Innis *et al.*, 1988, cada uno de los cuales se incorporan por referencia en el presente documento en su totalidad.

Otro método para amplificación es la reacción en cadena de la ligasa ("LCR"), desvelado en la Solicitud Europea n.º 320 308, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. El documento de patente de Estados Unidos n.º 4.883.750 describe un método similar a la LCR para pares de sondas de unión a una secuencia diana. También se puede usar un método basado en PCR™ y ensayo de ligasa de oligonucleótido (OLA) (descrito con mayor detalle a continuación), que se desvela en el documento Patente de Estados Unidos n.º 5.912.148.

Algunos métodos alternativos para la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos diana que se pueden usar en la práctica de la presente invención se desvelan en los documentos de Patente de Estados Unidos n.ºs 5.843.650, 5.846.709, 5.846.783, 5.849.546, 5.849.497, 5.849.547, 5.858.652, 5.866.366, 5.916.776, 5.922.574, 5.928.905, 5.928.906, 5.932.451, 5.935.825, 5.939.291 y 5.942.391, Solicitud de Gran Bretaña n.º 2 202 328 y en la Solicitud de PCT n.º PCT/US89/01025.

En la presente invención también se puede usar la Qbeta Replicasa, descrita en la solicitud de PCT n.º PCT/US87/00880 como un método de amplificación.

Un método de amplificación isotérmica, en el que se usan endonucleasas y ligasas de restricción para conseguir la amplificación de moléculas diana que contienen nucleótidos 5'-[alfa-tio]-trifosfatos en una hebra de un sitio de restricción también puede ser útil en la amplificación de ácidos nucleicos en la presente invención (Walker *et al.*, 1992). La Amplificación por Desplazamiento de Hebra (SDA), desvelada en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.916.779, es otro método para realizar la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos que implica múltiples rondas de desplazamiento y síntesis de hebra, es decir, traducción de cortes.

Otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico incluyen sistemas de amplificación basados en la transcripción (TAS), incluyendo la amplificación basada en secuencia de ácidos nucleicos (NASBA) y 3SR (Kwoh *et al.*, 1989; Solicitud de PCT WO 88/10315, incorporados en el presente documento por referencia en su totalidad). La Solicitud Europea n.º 329 822 desvela un método de amplificación de ácido nucleico que implica la síntesis cíclica de ARN monocatenario ("ARNmc"), ADNmc y ADN bicatenario (ADNbc), que se puede usar de acuerdo con la presente invención.

La solicitud PCT n.º WO 89/06700 desvela un esquema de amplificación de secuencias de ácidos nucleicos basado en la hibridación de una secuencia de región de promotor/cebador a un ADN monocatenario diana ("ADNmc") seguido de la transcripción de muchas copias de ARN de la secuencia. Este esquema no es cíclico, es decir, no se producen nuevos moldes a partir de las transcripciones de ARN resultantes. Otros métodos de amplificación incluyen "RACE" y "PCR unilateral" (Frohman, 1990; Ohara *et al.*, 1989).

### c. Detección de Ácidos Nucleicos

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

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

Los productos de amplificación se pueden visualizar, con o sin separación. Un método de visualización habitual implica la tinción de un gel con bromuro de etidio y la visualización de bandas con luz UV. Como alternativa, si los productos de amplificación se etiquetan de forma integral con nucleótidos etiquetados por vía radiométrica o fluorimétrica, los productos de amplificación separados se pueden exponer a una película de rayos X o se pueden visualizar con los espectros de excitación apropiados.

Después de la separación de los productos de amplificación, una sonda de ácido nucleico etiquetada se puede poner en contacto con la secuencia del marcador amplificado. Preferentemente, la sonda se conjuga con un cromóforo pero puede estar radioetiquetada. La sonda también se puede conjugar con una pareja de unión, tal como un anticuerpo o biotina, u otra pareja de unión que porta un resto detectable.

La detección también se puede producir por transferencia de Southern e hibridación con una sonda etiquetada. Las técnicas implicadas en la transferencia de Southern son bien conocidas por los expertos en la materia (véase Sambrook *et al.*, 2001). Un ejemplo de lo mencionado anteriormente se describe en el documento de patente de Estados Unidos n.º 5.279.721, que se incorpora por referencia en el presente documento, que desvela un aparato y un método para electroforesis automatizada y transferencia de ácidos nucleicos. El aparato permite la electroforesis y transferencia sin manipulación externa del gel y es ideal para realizar los métodos de acuerdo con la presente invención.

Otros métodos de detección de ácidos nucleicos que se pueden usar en la práctica de la presente invención se desvelan en los documentos de Patente de Estados Unidos n.ºs 5.840.873, 5.843.640, 5.843.651, 5.846.708, 5.846.717, 5.846.726, 5.846.729, 5.849.487, 5.853.990, 5.853.992, 5.853.993, 5.856.092, 5.861.244, 5.863.732, 5.863.753, 5.866.331, 5.905.024, 5.910.407, 5.912.124, 5.912.145, 5.919.630, 5.925.517, 5.928.862, 5.928.869, 5.929.227, 5.932.413 y 5.935.791.

### d. Otros Ensayos

Otros métodos para identificación sistemática se pueden usar dentro del alcance de la presente invención, por ejemplo, para detectar mutaciones en muestras de ADN genómico, ADNc y/o ARN. Algunos métodos usados para detectar mutaciones puntuales incluyen electroforesis en gel en gradiente desnaturizante ("DGGE"), análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos por restricción ("RFLP"), métodos de escisión química o enzimática, secuenciación directa de regiones diana amplificadas mediante PCR™ (véase anteriormente), análisis de polimorfismo de conformación monocatenario ("SSCP") y otros métodos bien conocidos en la técnica.

Un método para identificar sistemáticamente mutaciones puntuales se basa en la escisión de RNasa de faltas de coincidencias de pares de bases en heterodúplex de ARN/ADN o ARN/ARN. Como se usa en el presente documento, el término "falta de coincidencias" se define como una región de uno o más nucleótidos no emparejados o con faltas de coincidencias en una molécula de ARN/ARN, ARN/ADN ADN/ADN bicatenaria. Por lo tanto, esta definición incluye faltas de coincidencias debidas a mutaciones de inserción/delección, así como mutaciones puntuales de base sencilla o múltiple.

El documento de patente de Estados Unidos n.º 4.946.773 describe un ensayo de escisión de falta de coincidencia de RNasa A que implica la hibridación de muestras de ensayo de ADN o ARN monocatenario a una sonda de ARN, y el tratamiento posterior de los dúplex de ácido nucleico con RNasa A. Para la detección de faltas de coincidencias, los productos monocatenarios del tratamiento con RNasa A, separados por electroforesis de acuerdo con el tamaño, se comparan con dúplex de control tratados del mismo modo. Las muestras que contienen fragmentos más pequeños (productos de escisión) no observados en el dúplex de control se puntúan como positivas.

Otros investigadores han descrito el uso de RNasa I en ensayos de faltas de coincidencias. El uso de RNasa I para la detección de falta de coincidencias se describe en la bibliografía de Promega Biotech. Promega comercializa un kit que contiene RNasa I de la que se informa que escinde tres de cada cuatro faltas de coincidencias. Otros han descrito el uso de la proteína MutS u otras enzimas de reparación de ADN para detección de faltas de coincidencias de una sola

base.

Algunos métodos alternativos para detectar mutaciones de delección, inserción o sustitución que se pueden usar en la práctica de la presente invención se describen en los documentos de patente de Estados Unidos n.ºs 5.849.483, 5.851.770, 5.866.337, 5.925.525 y 5.928.870.

#### e. Ejemplos específicos de métodos de identificación sistemática de polimorfismo de ácido nucleico

Las mutaciones espontáneas que surgen durante el curso de la evolución en los genomas de algunos organismos a menudo no se transmiten de inmediato a través de todos los miembros de la especie, creando de esta manera alelos polimórficos que coexisten en las poblaciones de especies. A menudo, los polimorfismos son la causa de enfermedades genéticas. Se han identificado varias clases de polimorfismos. Por ejemplo, algunos polimorfismos de tipo nucleótido variable (VNTR), surgen de duplicaciones en tándem espontáneas de motivos de nucleótidos repetidos de di- o trinucleótidos. Si tales variaciones alteran la longitud de los fragmentos de ADN generados por escisión con endonucleasas de restricción, las variaciones se denominan polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Los RFLP se usan ampliamente en análisis genéticos en seres humanos y animales.

Otra clase de polimorfismos se generan por la sustitución de un solo nucleótido. Tales polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) rara vez dan como resultado cambios en un sitio de endonucleasa de restricción. Por lo tanto, los SNP en raras ocasiones se pueden detectar por análisis de longitud de fragmentos de restricción. Los SNP son las variaciones genéticas más comunes y se producen una vez cada 100 a 300 bases y se ha encontrado que varias mutaciones SNP afectan a un solo nucleótido en un gen que codifica la proteína de una manera suficiente para causar realmente una enfermedad genética. Algunas enfermedades de SNP a modo de ejemplo son hemofilia, anemia de células falciformes, hemocromatosis hereditaria, enfermedad de Alzheimer de inicio tardío, etc.

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

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

##### (1) Secuenciación de ADN

El método más comúnmente usado para caracterizar un polimorfismo es la secuenciación directa de ADN del locus genético que flanquea e incluye el polimorfismo. Un análisis de este tipo se puede conseguir usando ya sea el "método de terminación de cadena mediada por didesoxi", también conocido como "Método de Sanger" (Sanger *et al.*, 1975) o el "método de degradación química", también conocido como "método de Maxam-Gilbert" (Maxam *et al.*, 1977). Algunas tecnologías de secuenciación en combinación con tecnologías de amplificación genómica específica de secuencia, tales como la reacción en cadena de la polimerasa se pueden usar para facilitar la recuperación de los genes deseados (Mullis *et al.*, 1986; Solicitud de Patente Europea n.º 50.424; Solicitud de Patente Europea n.º 84.796, Solicitud de Patente Europea n.º 258.017. Solicitud de Patente Europea n.º 237.362; Solicitud de Patente Europea n.º 201.184; documentos de Patente de Estados Unidos n.ºs 4.683.202; 4.582.788; y 4.683.194).

##### (2) Resistencia a exonucleasa

Otros métodos que se pueden usar para determinar la identidad de un nucleótido presente en un sitio polimórfico usan un derivado de nucleótido resistente a exonucleasa especializado (documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.656.127). Un cebador complementario a una secuencia alélica inmediatamente en el sitio en la posición 3' con respecto al sitio polimórfico se hibrida con el ADN en investigación. Si el sitio polimórfico en el ADN contiene un nucleótido que es complementario al derivado de nucleótido resistente a exonucleótido en particular, entonces ese derivado se incorporará mediante una polimerasa en el extremo del cebador hibridado. Una incorporación de este tipo hace que el cebador resistente a la escisión con exonucleasa y por lo tanto permite su detección. Como se conoce la identidad del derivado resistente a exonucleótido, el nucleótido específico presente en el sitio polimórfico del ADN se puede determinar.

##### (3) Métodos de microsecuenciación

Se han descrito otros varios procedimientos de incorporación de nucleótido guiada por cebador para someter a ensayo algunos sitios polimórficos en el ADN (Komher *et al.*, 1989; Sokolov, 1990; Syvanen 1990; Kiipuswamy *et al.*, 1991; Prezant *et al.*, 1992; Ugozzoll *et al.*, 1992; Nyren *et al.*, 1993). Estos métodos se basan en la incorporación de desoxinucleótidos etiquetados para discriminar entre bases en un sitio polimórfico. Dado que la señal es proporcional al número de desoxinucleótidos incorporados, los polimorfismos que se producen en realizaciones del mismo dan como resultado una señal que es proporcional a la longitud de la realización (Syvanen *et al.*, 1990).

(4) Extensión en solución

El documento de patente francesa n.º 2.650.840 y la Solicitud de PCT WO91/02087 discuten un método con base de solución para determinar la identidad del nucleótido de un sitio polimórfico. De acuerdo con estos métodos, se usa un cebador complementario a las secuencias alélicas inmediatamente en la posición 3' con respecto a un sitio polimórfico. La identidad del nucleótido de ese sitio se determina usando derivados de didesoxinucleótido que se incorporan en el extremo del cebador si fuera complementario con el nucleótido del sitio polimórfico.

(5) Análisis de trozos genéticos o en extensión en fase sólida

La Solicitud de PCT WO92/15712 describe un método que usa mezclas de terminadores etiquetados y un cebador que es complementario a la secuencia en la posición 3' con respecto a un sitio polimórfico. El terminador etiquetado que se incorpora es complementario al nucleótido presente en el sitio polimórfico de la molécula diana que se está evaluando y se identifica de ese modo. En el presente documento, el cebador o la molécula diana se inmoviliza en una fase sólida.

(6) Ensayo de ligamiento de oligonucleótidos (OLA)

Este es otro método en fase sólida que usa una metodología diferente (Landegren *et al.*, 1988). Se usan dos oligonucleótidos, capaces de hibridarse con secuencias colindantes monocatenarias de un ADN diana. Uno de estos oligonucleótidos está biotinilado mientras que el otro está etiquetado de forma detectable. Si la secuencia complementaria precisa se encuentra en una molécula diana, los oligonucleótidos se hibridarán de modo que sus extremos se apoyen, y crean un sustrato de ligamiento. La ligamiento permite la recuperación del oligonucleótido etiquetado usando avidina. También se han descrito otros ensayos de detección de ácidos nucleicos, basados en este método, combinados con PCR (Nickerson *et al.*, 1990). En el presente documento, la PCR se usa para conseguir la amplificación exponencial del ADN diana, que a continuación se detecta usando el OLA.

(7) Análisis de trozo genético mediado por ligasa/polimerasa

El documento de patente de Estados Unidos n.º 5.952.174 describe un método que también implica a dos cebadores capaces de hibridarse con secuencias colindantes de una molécula diana. El producto hibridado se forma sobre un soporte sólido en el que se inmoviliza la diana. En el presente documento, la hibridación se produce de un modo tal que los cebadores se separan los unos de los otros por un espacio de un solo nucleótido. La incubación de este producto hibridado en presencia de una mezcla de una polimerasa, una ligasa, y un trifosfato de nucleósido contiene al menos un trifosfato de desoxinucleósido permite la ligamiento de cualquier par de oligonucleótidos hibridados colindantes. La adición de una ligasa da como resultado dos sucesos requeridos para generar una señal, extensión y ligamiento. Esto proporciona una especificidad más elevada y un "ruido" más bajo que los métodos que usan cualquiera de extensión o ligamiento solas y a diferencia de los ensayos basados en polimerasa, este método aumenta la especificidad de la etapa de polimerasa combinándolo con una segunda hibridación y una etapa de ligamiento para que una señal a unir a la fase sólida.

(8) Reacciones de escisión invasiva

Algunas reacciones de escisión invasivas se pueden usar para evaluar el ADN celular para un polimorfismo en particular. Una tecnología denominada INVADER® usa este tipo de reacciones (por ejemplo, de Arruda *et al.*, 2002, Stevens *et al.*, 2003). Por lo general, hay tres moléculas de ácido nucleico: 1) un oligonucleótido cadena arriba del sitio diana ("oligo cadena arriba"), 2) un oligonucleótido sonda que cubre el sitio diana ("sonda"), y 3) un ADN monocatenario con el sitio diana ("diana"). El oligo de cadena arriba y la sonda no se solapan pero contienen secuencias contiguas. La sonda contiene un fluoróforo donante, tal como fluoresceína, y un colorante aceptor, tal como Dabcilo. El nucleótido en el extremo en la posición 3' terminal del oligo cadena arriba se solapa ("invade") la el primer par de bases de un dúplex de sonda-diana. A continuación, la sonda se escinde por una estructura específica de nucleasa en la posición 5' que causa la separación del par de fluoróforo/inactivador, que aumenta la cantidad de fluorescencia que se puede detectar. Véase Lu *et al.*, 2004.

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

(9) Otros métodos para detectar los SNP

A continuación se presentan otros varios métodos específicos para la detección e identificación de polimorfismo y se pueden usar como tal o con modificaciones adecuadas en conjunto con la identificación de polimorfismos del gen de NOS3 en la presente invención. También se describen otros varios métodos en el sitio web de SNP del NCBI en Internet en [ncbi.nlm.nih.gov/SNP](http://ncbi.nlm.nih.gov/SNP), que se incorpora en el presente documento por referencia.

Algunos haplotipos extendidos se pueden determinar en cualquier locus dado en una población, que permite la identificación de exactamente que SNP serán redundantes y lo que será fundamental en los estudios de asociación. Lo último se conoce como "SNP de etiqueta de haplotipo (htSNPs)", marcadores que capturan los haplotipos de un gen o una región de desequilibrio de unión. Véase Johnson *et al.* (2001) y Ke y Cardon (2003), para métodos a modo de

ejemplo.

5 El ensayo de VDA usa amplificación por PCR de segmentos genómicos mediante métodos de PCR largos que usan reactivos TaKaRa LA Taq y otras condiciones de reacción convencionales. La amplificación larga puede amplificar tamaños de ADN de aproximadamente 2.000-12.000 pb. La hibridación de los productos a matriz de detector variante (VDA) se puede realizar mediante un Centro de Identificación Sistemática de Alto Rendimiento Affymetrix y el análisis se realiza con software informático.

10 Un método denominado Ensayo de Chip usa amplificación por PCR de segmentos genómicos mediante protocolos de PCR convencionales o largos. Algunos productos de hibridación se analizan mediante VDA, Halushka *et al.* (1999). Los SNP se clasifican por lo general como "Cierto" o "Probable" basándose en análisis informático de patrones de hibridación. Mediante comparación con métodos de detección alternativos tales como secuenciación de nucleótidos, los SNP "Ciertos" se han confirmado un 100 % de las veces; y los SNP "Probables" se han confirmado un 73 % de las veces con este método.

15 Otros métodos simplemente implican amplificación por PCR después de digestión con la enzima de restricción pertinente. Sin embargo, otros implican la secuenciación de productos de PCR purificados de regiones genómicas conocidas.

20 En otro método, los exones individuales o fragmentos de solapamiento de grandes exones se amplifican por PCR. Los cebadores se diseñan a partir de secuencias publicadas o de bases de datos o y la amplificación por PCR de ADN genómico se realiza usando las siguientes condiciones: 200 ng de molde de ADN, 0,5 µM de cada cebador, 80 µM cada uno de dCTP, dATP, dTTP y dGTP, formamida al 5 %, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 0,5 U de Taq polimerasa y 0,1 volúmenes del tampón de Taq. Se realiza ciclado térmico y los productos de PCR resultantes se analizan mediante PCR y análisis de polimorfismo de conformación monocatenario (PCR-SSCP), bajo una variedad de condiciones, por ejemplo, gel de poliacrilamida al 5 % o al 10 % con un 15 % de urea, con o sin glicerol al 5 %. La electroforesis se realiza durante una noche. Los productos de PCR que muestran cambios de movilidad se vuelven a amplificar y secuenciar para identificar variaciones de nucleótidos.

30 En un método denominado CGAP-GAI (DEMIGLACE), los datos de secuencia y alineación (desde un archivo PHRAP.ace), puntuaciones de calidad para las llamadas de bases de secuencia (a partir de archivos de calidad PHRED), información de distancia (a partir de programas PHYLEP dnadist y vecinos) y datos de llamada de base (interruptor de PHRED '-d') se cargan en la memoria. Las secuencias se alinean y se examinan para cada trozo vertical ("corte") del conjunto resultante para desacuerdo. Cualquier corte de este tipo se considera un SNP candidato (DEMIGLACE). Una serie de filtros se usan por DEMIGLACE para eliminar cortes que probablemente no van a representar polimorfismos verdaderos. Estos filtros incluyen: (i) excluir secuencias en cualquier corte dado a partir de la consideración de SNP en la que las puntuaciones de calidad de secuencias disminuyen en un 40 % o más; (ii) excluir llamadas en las que la amplitud máxima está por debajo del décimo quinto percentil de todas las llamadas de base para ese tipo de nucleótido; (iii) descalificar regiones de una secuencia que tiene un número elevado de desacuerdos con el consenso de participación en los cálculos de SNP; (iv) retirar de la consideración cualquier llamada de base con una llamada alternativa en la que el máximo ocupa un 25 % o más del área del denominado pico; (v) excluir variaciones que se producen solamente en una dirección de lectura. Las puntuaciones de calidad de PHRED se convirtieron en valores de probabilidad de error para cada nucleótido en el corte. Los métodos bayesianos convencionales se usan para calcular la probabilidad posterior de que hay evidencia de heterogeneidad de nucleótidos en un lugar determinado.

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

55 En un método denominado DEBNICK (MÉTODO B), se realiza un análisis comparativo de secuencias EST agrupadas y se confirma mediante secuenciación de ADN basada en fluorescencia. En un método relacionado, denominado DEBNICK (MÉTODO C), el análisis comparativo de secuencias EST agrupadas con calidad phred > 20 en el sitio de la falta de coincidencia, calidad phred media >= 20 con respecto a 5 bases FLANK en la posición 5' y en la posición 3' con respecto al SNP, sin faltas de coincidencias en 5 bases en las posiciones 5' y 3' con respecto al SNP, al menos dos apariciones de cada alelo se realiza y se confirma mediante el examen de trazas.

60 En un método identificado por ERO (RESEQ), se diseñan nuevos conjuntos de cebadores para los STS publicados por vía electrónica y se usan para amplificar el ADN de 10 diferentes cepas de ratón. El producto de amplificación de cada cepa a continuación se purifica en gel y se secuencia usando una técnica convencional de secuenciación de ciclos, didesoxi con extermidores etiquetados con <sup>33</sup>P. Todas las reacciones terminadas con ddATP se cargan a continuación en calles adyacentes de un gel de secuenciación seguido de todas las reacciones ddGTP y así sucesivamente. Los SNP se identifican mediante el análisis visual de las radiografías.

65 En otro método identificado como ERO (RESEQ-HT), se diseñan nuevos conjuntos de cebadores para las secuencias de ADN murino publicadas por vía electrónica y se usan para amplificar el ADN de 10 cepas diferentes de ratón. El

producto de amplificación de cada cepa se prepara para secuenciación mediante tratamiento con Exonucleasa I y Fosfatasa Alcalina de Gamba. La secuenciación se realiza usando el Kit de Reacción de ABI Prism Big Dye Terminator Ready (Perkin-Elmer) y las muestras de secuencia se desarrollan en el Analizador de ADN 3700 DNA (secuenciador 96 Capillary).

5 FGU-CBT (SCA2-SNP) identifica un método en el que la región que contiene el SNP se amplifica por PCR usando los cebadores SCA2-FP3 y SCA2-RP3. Aproximadamente 100 ng de ADN genómico se amplifican en un volumen de reacción de 50 µl que contiene una concentración final de Tris 5 mM, KCl 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,75 mM, gelatina al 0,05 %, 20 pmol de cada cebador y 0,5 U de Taq ADN polimerasa. Las muestras se desnaturalizan, se hibridan y se extienden  
10 y el producto PCR se purifica a partir de una banda cortada del gel de agarosa usando, por ejemplo, el kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen) y se secuencia usando química de terminador de colorante en un secuenciador de ADN automatizado ABI Prism 377 con los cebadores de PCR.

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

20 En un método descrito como KWOK (1), los SNP se identifican mediante la comparación de datos de secuencia genómica de alta calidad de cuatro individuos elegidos al azar mediante secuenciación directa de ADN de productos de PCR con química de terminador con colorante (véase Kwok *et al.*, 1996). En un método relacionado identificado como KWOK (2), los SNP se identifican mediante la comparación de los datos de secuencia genómica de alta calidad de a partir de solapamiento de clones de gran inserción tales como cromosomas artificiales bacterianos (BAC) o cromosomas artificiales basados en P1 (PAC). A continuación, se desarrolla un STS que contiene este SNP y la  
25 existencia del SNP en varias poblaciones se confirma por secuenciación de ADN combinado (véase Taillon-Miller *et al.*, 1998). En otro método similar denominado KWOK (3), los SNP se identifican mediante la comparación de los datos de secuencia genómica de alta calidad del solapamiento de los BAC o PAC de clones de gran inserción. Los SNP encontrados con este enfoque representan variaciones de secuencia de ADN entre los dos cromosomas donantes pero las frecuencias de los alelos en la población general todavía no se han determinado. En el método KWOK (5), los  
30 SNP se identifican mediante la comparación de los datos de la secuencia genómica de alta calidad de una muestra de ADN homocigoto y una o más muestras de ADN combinadas mediante secuenciación de ADN directa de productos de PCR con química de terminador de colorante. Los STS usados se desarrollan a partir de datos de secuencias que se encuentran en las bases de datos disponibles al público. De forma específica, estos STS se amplifican mediante PCR frente a una mola hidatiforme completa (CHM) que se ha mostrado que es homocigota en todos los loci y un grupo de  
35 muestras de ADN de 80 precursores de CEPH (véase Kwok *et al.*, 1994).

En otro método de este tipo, KWOK (OverlapSnpDetectionWithPolyBayes), los SNP se descubren mediante análisis informático automatizado del solapamiento de regiones de secuencias de clones genómico suman los de gran  
40 inserción. Para la adquisición de datos, las secuencias de clones se obtienen directamente de centros de secuenciación a gran escala. Esto es necesario porque las secuencias de calidad de base no están presentes/disponibles a través de GenBank. El procesamiento de datos sin procesar implica el análisis de secuencias de clones y la información de calidad de base de acompañamiento para coherencia. A las secuencias terminadas ('base perfecta', tasa de error inferior a 1 en 10.000 pb) sin secuencias sin calidad de base asociadas se les asigna un valor uniforme de calidad de base de 40 (tasa de error de 1 en 10.000 pb). Las secuencias de borrador sin valores de  
45 calidad de base se rechazan. Las secuencias procesadas se introducen en una base de datos local. Una versión de cada secuencia con repeticiones humanas conocidas enmascaradas también se almacena. La repetición del enmascaramiento se realiza con el programa "MASKERAID". Detección de solapamiento: Los supuestos solapamientos se detectan con el programa "WUBLAST". Varias etapas de filtrado seguidas en orden para eliminar resultados de detección de solapamiento falsos, es decir, similitudes entre un par de secuencias de clones que se  
50 presentan debido a la duplicación de secuencias en contraposición a cierto solapamiento. La longitud total del solapamiento, el porcentaje de similitud general, el número de diferencias de secuencias entre nucleótidos con valor de calidad de base elevado "faltas de coincidencias de alta calidad". Los resultados también se comparan con los resultados de la formación de mapas de fragmentos de restricción de clones genómicos en el Centro de Secuenciación del Genoma de la Universidad de Washington, los informes de definición sobre solapamientos, y los resultados de los  
55 esfuerzos de creación de la secuencia contig en el NCBI. Detección de SNP: los pares de solapamiento de secuencia de clon se analizan para determinar sitios de SNP candidatos con el software de detección de SNP 'POLYBAYES'. Las diferencias de la secuencia entre el par de secuencias se puntúan para la probabilidad de representar la verdadera variación de la secuencia en comparación con la secuencia de error. Este proceso requiere la presencia de valores de calidad de base para ambas secuencias. Los candidatos con puntuación elevada se extraen. La búsqueda se limita a variaciones de pares de bases individuales de tipo sustitución. La puntuación de confianza del SNP candidato se  
60 calcula con el software POLYBAYES.

En el método identificado por KWOK (ensayo TaqMan), el ensayo TaqMan se usa para determinar los genotipos de 90 individuos al azar. En el método identificado por KYUGEN (Q1), las muestras de ADN de las poblaciones indicadas se combinan y se analizan por PLACE-SSCP. Las alturas de los picos de cada alelo en el análisis combinado se corrigen por aquellos en un heterocigoto, y se usan posteriormente para el cálculo de las frecuencias de alelos. Las frecuencias

de alelo superiores a un 10 % se cuantifican de forma fiable mediante este método. Frecuencia alélicas = 0 (cero) significa que el alelo se encontró entre individuos, pero el pico correspondiente no se ve en el examen de la combinación. Frecuencia alélica = 0-0,1 indica que los alelos minoritarios se detectan en la combinación, pero los picos son demasiado bajos para cuantificar de forma fiable.

5 En aún otro método identificado como KYUGEN (Método 1), los productos de PCR se etiquetan posteriormente con colorantes fluorescentes y se analizan mediante un sistema automatizado de electroforesis capilar en condiciones de SSCP (PLACE-SSCP). Cuatro o más ADN individuales se analizan con o sin dos ADN combinados (combinación japonesa y combinación de precursores de CEPH) en una serie de experimentos. Los alelos se identifican mediante  
10 inspección visual. Los ADN individuales con diferentes genotipos se secuencian y los SNP se identifican. Las frecuencias alélicas se calculan a partir de alturas de los picos en las muestras combinadas después de la corrección del sesgo de la señal usando alturas de los picos en heterocigotos. Para la PCR, los cebadores se etiquetan para que tengan 5'-ATT o 5'-GTT en sus extremos para etiquetado posterior de ambas hebras. Las muestras de ADN (10 ng/ul) se amplifican en mezclas de reacción que contienen el tampón (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3 o 9,3, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,0  
15 mM), 0,25 μM de cada cebador, 200 μM de cada dNTP, y 0,025 unidades/μl de Taq ADN polimerasa mezclados previamente con el anticuerpo anti-Taq. Las dos hebras de los productos de PCR se etiquetan de forma diferencial con nucleótidos modificados con R110 y R6G mediante una reacción de intercambio de fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I. La reacción se detiene añadiendo EDTA, y los nucleótidos no incorporados se desfosforilan mediante la adición de fosfatasa alcalina intestinal de ternero. Para el SSCP: una alícuota de productos de PCR etiquetados con  
20 fluorescencia y marcadores internos etiquetados con TAMRA se añade a formamida desionizada y desnaturalizada. La electroforesis se realiza en un capilar usando un Analizador Genético ABI Prism 310. Los software de Genescan (P-E Biosystems) se usan para recogida de datos y procesamiento de datos. El ADN de individuos (de dos a once) incluyendo los que presentaban diferentes genotipos en SSCP se someten a secuenciación directa usando química de terminador big-dye, en secuenciadores ABI Prism 310. Se procesan múltiples archivos de trazas de secuencia obtenidos a partir de ABI Prism 310 y se alinean con Phred/Phrap y se visualizan usando el visor Consed. Los SNP se  
25 identifican con el software PolyPhred e inspección visual.

Además, en otro método identificado como KYUGEN (Método 2), se buscan individuos con diferentes genotipos mediante HPLC desnaturaliza ante (DHPLC) o PLACE-SSCP (Inazuka *et al.*, 1997) y sus secuencias se determinan  
30 para identificar los SNP. La PCR se realiza con cebadores etiquetados con 5'-ATT o 5'-GTT en sus extremos para el etiquetado posterior de ambas hebras. El análisis de DHPLC se realiza usando el sistema de análisis de fragmentos de WAVE ADN (Transgenomic). Los productos de PCR se inyectan en la columna de DNasep, y se separan en las condiciones determinadas usando al programa WAVEMaker (Transgenomic). Las dos hebras de los productos de PCR que se etiquetan de forma diferencial con nucleótidos se modifican con R110 y R6G mediante una reacción de intercambio de fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I. La reacción se detiene mediante la adición de EDTA, y los nucleótidos no incorporados se desfosforilan mediante la adición de fosfatasa alcalina de intestino de ternera. SSCP seguido por electroforesis se realiza en un capilar usando un Analizador Genético ABI Prism 310. software GeneScan (P-E Biosystems). El ADN de los individuos, incluyendo aquellos que presentaban diferentes genotipos en  
35 DHPLC o SSCP se someten a secuenciación directa usando química de terminador big-dye, en el secuenciador ABI Prism 310. Se procesan múltiples archivos de traza de secuencia obtenidos a partir de ABI Prism 310 y se alinean mediante Phred/Phrap y se visualizan usando el visor Consed. Los SNP se identifican con el software PolyPhred e inspección visual. Los datos de cromatograma de trazas de secuencias EST en Unigene se procesan con PHRED. Para identificar los SNP similares, las faltas de coincidencia de bases individuales forman a partir de múltiples alineamientos de secuencias producidos por los programas PHRAP, BRO y POA para cada grupo de Unigene. BRO corregía las posibles orientaciones de EST mal informadas, mientras que POA identificaba y analizaba estructuras de  
40 alineamiento no lineales indicativas de mezclas/quimeras genéticas que podrían producir SNP falsos. La inferencia bayesiana se usa para ponderar la evidencia de polimorfismo verdadero en comparación con el error, falta de alineación o ambigüedad de la secuenciación, formación de grupos erróneos o secuencias químicas de EST, evaluación de datos tales como altura del cromatograma sin procesar, nitidez, solapamiento y espaciado; tasas de error de secuenciación; sensibilidad al contexto; origen de la biblioteca de ADNc, etc.

En el método identificado como MARSHFIELD (Método B), el solapamiento de secuencias de ADN humano que contenían los supuestos polimorfismos de inserción/delección se identifican a través de búsquedas en bases de datos  
55 públicas. Los cebadores de PCR que flanqueaban cada sitio polimórfico se seleccionan entre las secuencias consenso. Los cebadores se usan para amplificar ADN genómico humano individual o combinado. Los productos de PCR resultantes se resuelven en un gel de poliacrilamida desnaturalizante y se usa un PhosphorImager para calcular las frecuencias alélicas de los grupos de ADN.

#### 60 f. Desequilibrio de la unión

Los polimorfismos en desequilibrio de unión con otro polimorfismo en el que la identificación de un polimorfismo son predictivos de la identidad del polimorfismo relacionado. "Desequilibrio de unión" ("LD", como se usa en el presente documento, aunque en la técnica también se denomina "LED") se refiere a una situación en la que una combinación de  
65 alelos en particular (es decir, una forma variante de un gen dado) o polimorfismos en dos loci aparecen de forma más frecuente de lo que se podría esperar al azar. "Significativo" como se usa con respecto al desequilibrio de unión, tal como lo determina un experto en la materia, se contempla que es un valor p o  $\alpha$  estadísticamente significativo que

puede ser 0,25 o 0,1 y puede ser 0,1, 0,05, 0,001, 0,00001 o inferior. The el polimorfismo en la posición 874 en el gen de NOS3 se puede determinar por evaluación de la secuencia de ácidos nucleicos de un polimorfismo en desequilibrio de unión con el polimorfismo en la posición 874. La invención se puede poner en práctica de esta manera con respecto a uno o más polimorfismos para conseguir análisis de haplotipos. "Haplotipo" se usa de acuerdo con significado sencillo y habitual para un experto en la materia. Se refiere a un genotipo colectivo de dos o más alelos o polimorfismos junto con uno de los cromosomas homólogos.

El término "polimorfismo", como se usa en el presente documento, se refiere a una diferencia en la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos de una región de nucleótidos o aminoácidos dada en comparación con una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos en la región correspondiente de otro individuo de la misma especie. Preferentemente, la especie es el ser humano. Un polimorfismo se define por lo general en relación con una secuencia de "referencia". En la presente solicitud, secuencia de "referencia" y secuencia de "tipo silvestre" se utilizan indistintamente. Los polimorfismos de nucleótidos incluyen diferencias de un solo nucleótido, diferencias en la secuencia de más de un nucleótido, e inserciones, inversiones, sustituciones y deleciones de nucleótidos simples o múltiples. Algunos polimorfismos de aminoácidos incluyen diferencias de aminoácidos individuales, diferencias en la secuencia de más de un aminoácido, e inserciones, sustituciones y deleciones de aminoácidos individuales o múltiples.

Una "muestra biológica" incluye una diversidad de tipos de muestras obtenidas de un individuo y se pueden usar en un ensayo de diagnóstico o de control. La definición incluye muestras de sangre y otras muestras de líquidos de origen biológico, muestras de tejido sólido tal como una muestra de ensayo de biopsia o cultivos de tejidos o células derivadas de los mismos y la progenie de los mismos. La definición también incluye muestras que se han manipulado de cualquier manera después de su adquisición, tal como mediante tratamiento con reactivos, solubilización, o enriquecimiento para ciertos componentes, tales como polinucleótidos. La expresión muestra biológica incluye una muestra clínica, y también incluye células en cultivo, sobrenadantes de células, lisados de células, suero, plasma, fluido biológico, y muestras de tejido. En una realización, la muestra se recoge por el individuo. Por ejemplo, un individuo puede recoger un hisopo de tejido del interior de la mejilla para su uso como una muestra de ácido nucleico. Como se sabe en la técnica, se pueden usar muchos tipos de muestras para la extracción de ácidos nucleicos.

Como se usa en el presente documento, el término "tratar" en referencia a una enfermedad o afección se refiere a una reducción de la gravedad o eliminación de uno o más síntomas asociados con una enfermedad o afección en particular. Por lo tanto, el tratamiento de un trastorno no significa necesariamente una reducción de la gravedad de todos los síntomas asociados con un trastorno y no significa necesariamente una reducción completa de la gravedad de uno o más síntomas asociados con un trastorno. El tratamiento, como se usa en este contexto, incluye cualquier tratamiento de una afección sintomática, tal como una reacción adversa en un mamífero, en particular un ser humano, e incluye: (a) diagnóstico y a continuación evitar que la reacción adversa se produzca en un individuo que puede estar predispuesto a la reacción pero que aún no se ha diagnosticado que la tenga; (B) inhibición de la reacción adversa, es decir, detención de su desarrollo; y (c) alivio de la reacción adversa, es decir, causar la regresión de la reacción.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz en el tratamiento de un trastorno particular; que es una cantidad que es eficaz para reducir la gravedad de uno o más síntomas asociados con la enfermedad o afección en particular para la que se busca tratamiento. El término "mejorar", como se usa por ejemplo en la mejora de una afección en particular se refiere a hacer que uno o más síntomas de la afección sean al menos más tolerables, si no mejor. El término mejorar no se refiere necesariamente a un aumento de la tolerancia de todos los síntomas asociados con un trastorno y no se refiere necesariamente a una reducción completa de la gravedad de uno o más síntomas asociados con un trastorno.

Se puede añadir una etapa adicional en la que una parte del gen de NOS3 de SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 3 se amplifica antes de la etapa de identificación. En otra realización, la identificación se realiza con un método seleccionado entre el grupo que consiste en un ensayo de hibridación, un ensayo de secuenciación, un ensayo de microsecuenciación, un ensayo de MALDI-TOF, y un ensayo de amplificación específica de alelo. En una realización adicional, la identificación se realiza mediante un ensayo basado en anticuerpos.

La farmacogenómica permite que un profesional clínico o médico dirija los tratamientos profilácticos o terapéuticos a las personas que más se beneficiarán del tratamiento y evite el tratamiento de individuos que van a experimentar efectos secundarios sintomáticos, en el caso de LA-419 el efecto secundario adverso puede ser la tolerancia y toxicidad al fármaco. Las diferencias en el metabolismo de agentes terapéuticos pueden conducir a toxicidad grave o fallo terapéutico mediante la alteración de la relación entre la dosis y concentración en sangre del fármaco farmacológicamente activo. Por lo tanto, un profesional médico o clínico puede considerar la aplicación del conocimiento obtenido en estudios de farmacogenómica relevantes para determinar si se administra LA-419 así como la adaptación de la dosificación, régimen y/o cantidades terapéuticamente eficaces a administrar para conseguir el efecto deseado por el tratamiento con el modulador.

Una determinación de cómo un polimorfismo de NOS3 dado es predictiva de la probabilidad de un individuo de responder a un donante de NO se puede conseguir mediante la determinación del genotipo del individuo en el gen de NOS3, tal como se describe en el presente documento. La información generada a partir de uno o más de estos enfoques se puede usar para determinar los regímenes de dosificación y tratamiento apropiados para el tratamiento

profiláctico o terapéutico de un individuo. Este conocimiento, cuando se aplica a la dosificación o selección de fármacos, puede evitar reacciones adversas o fracaso terapéutico y de este modo puede aumentar la eficacia terapéutica o profiláctica cuando se trata un individuo con un modulador del receptor de niacina, tal como niacina o un análogo de la misma.

5 Se desvela que la diferencia en la secuencia de proteínas puede proporcionar una base para determinar la secuencia de nucleótidos en la posición 894. La secuencia de NOS3 de tipo silvestre codifica una Glu en la posición 298, al contrario que la Asp en esa posición cuando hay una T en la posición 894. Un experto en la materia observa que hay disponibilidad de reactivos y ensayos para detectar las diferentes proteínas. En algunas realizaciones, un método o kit implica un anticuerpo que reconoce ambas formas de la proteína o solamente una forma. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal.

15 Se desvelan kits para su uso en los métodos de la invención, por ejemplo, un kit para determinar un nivel de probabilidad de respuesta a la terapia con LA-419 para un individuo con una afección, un kit para uso de una cigocidad de NOS3 de un individuo para determinar una idoneidad o una falta de idoneidad de un individuo para su inclusión en un ensayo clínico, o un kit para determinar un nivel de probabilidad para una afección asociada con la insuficiencia cardiaca. Un kit puede comprender reactivos e instrucciones para realizar los métodos que se describen en el presente documento. Por ejemplo, un kit puede incluir reactivos a la formación de genotipos tales como reactivos para el aislamiento de moléculas de ácido nucleico y reactivos para la amplificación de moléculas de ácido nucleico tales como cebadores. Un kit también puede incluir, por ejemplo, un ensayo de NOS3 tal como un ELISA. Además, un kit puede contener muestras de control, por ejemplo, para mostrar que las reacciones de amplificación no están contaminadas.

25 Los contenidos del kit están contenidos en el material de envasado, preferentemente para proporcionar un ambiente estéril, libre de contaminantes. Además, el material de envasado contiene instrucciones que indican cómo se pueden usar los materiales dentro del kit. Las instrucciones de uso por lo general incluyen una expresión tangible que describe la concentración de reactivo o al menos un parámetro del método de ensayo, tal como las cantidades relativas de reactivo y muestra a mezclar, los periodos de tiempo de mantenimiento para las mezclas de reactivo/muestra, temperatura, condiciones de tampón, y similares .

### 30 III. MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE LA HIPERTROFIA CARDIACA

Una vez que se determina el genotipo de NOS3 del individuo, un curso terapéutico de tratamiento se puede individualizar. En el método como se desvelan el presente documento, el rasgo de interés es una respuesta clínica mostrada por un paciente a algún tratamiento terapéutico, por ejemplo, la respuesta a un fármaco donante de NO tal como, pero no limitado a, un LA-419. La expresión "respuesta clínica" se refiere a una medición cuantitativa de la eficacia o potencia de la terapia y sucesos adversos (es decir, efectos secundarios).

40 Por lo tanto, individuos homocigotos para un polimorfismo de inserción en el gen de NOS3 que tienen o se sospecha que tienen o están en riesgo de desarrollar insuficiencia cardiaca se pueden colocar en una terapia que incluye donantes de NO, tales como, pero no limitados a, LA-419. El donante de NO se puede administrar solo o en combinación con al menos otro agente, tal como un compuesto estabilizante.

#### 45 A. Vías de administración

La administración del donante de NO se puede realizar mediante cualquier número de vías que incluyen, pero no se limitan a oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, intradérmica, intratraqueal, intravesicular, intraocular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual o rectal. Algunos detalles adicionales con respecto a las técnicas para formulación y administración se pueden encontrar en la última edición de Pharmaceutical Sciences de Remington (Maack Publishing Co., Easton, Pa.). En ciertas realizaciones LA-419 u otros donantes de NO se formulan para administración oral.

#### B. Formulaciones

55 Cuando se contemplan aplicaciones clínicas, las composiciones farmacéuticas se prepararán en una forma apropiada para la aplicación deseada. Por lo general, esto supondrá la preparación de composiciones que están esencialmente libres de pirógenos, así como otras impurezas que puedan ser dañinas para seres humanos o animales.

60 En general, se deseará usar sales y tampones apropiados. Algunas composiciones acuosas comprenden una cantidad eficaz del fármaco disuelto o disperso en un vehículo farmacéuticamente aceptable o en un medio acuoso. Las expresiones "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen reacciones adversas, alérgicas u otras reacciones desfavorables cuando se administran a un animal o un ser humano. Como se usa en el presente documento, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye disolventes, tampones, soluciones, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares, aceptables para uso en la formulación de productos farmacéuticos, tal como los productos farmacéuticos adecuados para su administración a seres humanos. El uso de

tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en la que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con los principios activos de la presente invención, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También es posible incorporar principios activos suplementarios en las composiciones, con la condición de que no inactiven los vectores o las células de las composiciones.

Las composiciones activas de la presente invención pueden incluir preparaciones farmacéuticas clásicas. La administración de estas composiciones como se desvela en el presente documento se puede realizar mediante cualquier vía común, siempre y cuando el tejido diana esté disponible a través de esta vía. Esto incluye la vía oral, nasal o bucal. Como alternativa, la administración se puede realizar mediante inyección intradérmica, intraarterial, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa o mediante inyección directa en el tejido cardíaco. Normalmente, las composiciones de este tipo se podrían administrar como composiciones farmacéuticamente aceptables, como se ha descrito anteriormente.

Los compuestos activos también se pueden administrar por vía parenteral o intraperitoneal. A modo de ilustración, se pueden preparar soluciones de los compuestos activos en forma de la base libre o sales farmacológicamente aceptables en agua, mezcladas adecuadamente con un tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen por lo general un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen, por ejemplo, soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación en el momento de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Por lo general, estas preparaciones son estériles y lo suficientemente fluidas para ser fácilmente inyectables. Las preparaciones deberían ser estables en las condiciones de preparación y almacenamiento y se deberían proteger frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Algunos disolventes o medios de dispersión apropiados pueden contener, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede conseguir por medio de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. Una absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede conseguir mediante el uso de composiciones de agentes retardantes de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Por lo general, las composiciones de la presente invención se pueden formular en una forma neutra o de sal. Algunas sales farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) derivadas de ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico) o de ácidos orgánicos (por ejemplo, ácidos acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares). Algunas sales formadas con los grupos carboxilo libres de la proteína se pueden obtener también a partir de bases inorgánicas (por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o hierro) o de bases orgánicas (por ejemplo, isopropilamina, trietilamina, histidina, procaína y similares).

Después de su formulación, las soluciones se administran preferentemente de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad de modo que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se pueden administrar fácilmente en una diversidad de formas de dosificación, tales como disoluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármacos y similares. Para administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución por lo general se tampona de forma adecuada y el diluyente líquido se hace primeramente isotónico, por ejemplo, con solución salina o glucosa suficientes. Las soluciones acuosas de este tipo se pueden usar, por ejemplo, para administración por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. Preferentemente se usan medios acuosos estériles conocidos por los expertos en la materia, en particular, a la vista de la presente divulgación. A modo de ilustración, una dosis individual se puede disolver en 1 ml de una disolución isotónica de NaCl y añadir o bien a 1000 ml de fluido de hipodermocclisis o bien inyectarse en el sitio de infusión propuesto (véase, por ejemplo "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15ª edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Necesariamente se producirán algunas variaciones en la dosificación, dependiendo del estado del sujeto que se está tratando. En cualquier caso, la persona responsable de la administración determinará la dosis apropiada para cada sujeto individual. Además, para la administración a seres humanos, las preparaciones deberían satisfacer los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza según lo requiere la Oficina de Estándares Biológicos de la FDA.

## 1. Comprimidos y Cápsulas

Los expertos en la materia conocen bien algunas formulaciones de comprimidos o cápsulas. En algunas realizaciones, el fármaco es tal como se desvela en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.126.145.

En una realización, un comprimido comprende, en una mezcla, aproximadamente un 5-30 % de hidroxipropil metil celulosa de alta viscosidad, aproximadamente un 2-15 % de un aglutinante farmacéutico soluble en agua,

aproximadamente un 2-20 % de un componente hidrófobo tal como un material céreo, por ejemplo, un ácido graso, y aproximadamente un 30-90 % de principio activo.

## 2. Películas

Se desvelan algunos métodos para prevenir o tratar un paciente que tiene un polimorfismo homocigoto de tipo silvestre en el gen de NOS3 después de un procedimiento cardiaco invasivo que comprende administrar una película polimérica biocompatible, biodegradable que comprende un donante de NO, tal como LA-419, a un paciente. Las películas poliméricas son finas en comparación con su longitud y anchura. Por lo general, las películas tienen un espesor uniforme entre aproximadamente 60 micrómetros y aproximadamente 5 mm. Algunas películas tienen entre aproximadamente 600 micrómetros y 1 mm y entre aproximadamente 1 mm y 5 mm de espesor, así como películas entre aproximadamente 60 micrómetros y aproximadamente 1000 micrómetros, y entre aproximadamente 60 micrómetros y aproximadamente 300 micrómetros son útiles en la fabricación de implantes terapéuticos para su inserción en el cuerpo del paciente. Las películas se pueden administrar al paciente de una manera similar a los métodos usados en cirugías de adhesión. Por ejemplo, una formulación de película de donante de NO se puede pulverizar o golpear en un sitio de tejido o arteria cardiacos durante la cirugía, o una película formada se puede colocar sobre el sitio del tejido seleccionado. En una realización alternativa, la película se puede usar como revestimiento de liberación controlada en un dispositivo médico tal como una endoprótesis vascular, como se discute con más detalle a continuación.

Algunos polímeros biodegradables o no biodegradables se pueden usar para fabricar implantes en los que el donante de NO se distribuye de forma uniforme a través de toda la matriz polimérica. En la técnica se conoce una serie de polímeros biodegradables adecuados para su uso en la preparación de películas biodegradables de la presente invención, incluyendo polianhídridos y poliésteres alifáticos, preferentemente ácido poli láctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA) y mezclas y copolímeros de los mismos, más preferentemente copolímeros a 50:50 de PLA:PGA y lo más preferentemente copolímeros a 75:25 de PLA:PGA. También se pueden usar enantiómeros individuales de PLA, preferentemente L-PLA, ya sea solo o en combinación con PGA. Para preparar los implantes de la presente invención también se pueden usar policarbonatos, polifumaratos y caprolactonas.

La cantidad del donante de NO a incorporar en las películas poliméricas de la presente invención es una cantidad eficaz para mostrar un efecto que se puede medir en el tratamiento de enfermedades que tienen estados patofisiológicos similares, tales como, pero no se limitan a, insuficiencia cardiaca. La composición de la presente invención se puede incorporar en la película mediante diversas técnicas tales como métodos en solución, métodos en suspensión, o prensado en estado fundido.

## 3. Dispositivo de Parche Transdérmico

La administración transdérmica implica la administración de un agente terapéutico a través de la piel para distribución tanto del organismo mediante la circulación sanguínea. La administración transdérmica se puede comparar con la administración intravenosa controlada, continúa de un fármaco usando la piel como un puerto de entrada en lugar de una aguja intravenosa. El agente terapéutico pasa a través de las capas más externas de la piel y se difunde en los capilares o vasos sanguíneos diminutos en de la piel, y a continuación se transporta en el sistema circulatorio principal.

En la técnica se conocen bien algunos dispositivos de parche transdérmico que proporcionan una administración continua, controlada de un agente terapéutico a través de la piel. Tales dispositivos, por ejemplo, se desvelan en las Patentes de Estados Unidos n.<sup>os</sup> 4.627.429; 4.784.857; 5.662.925; 5.788.983; y 6.113.940.

De forma característica, estos dispositivos contienen una capa soporte impermeable al fármaco que define la superficie externa del dispositivo y una membrana permeable que se une a la piel, tal como una capa de adhesivo, sellada a la capa de barrera de una manera tal como para crear un depósito entre las mismas, en la que se coloca el agente terapéutico. Algunas realizaciones implican una formulación del donante de NO que se introduce en el depósito de un parche transdérmico se usa por un paciente que es homocigoto de tipo silvestre en la posición 894 en el gen de NOS3.

## 4. Dispositivos Médicos

También se desvela la incorporación de un donante de NO en un dispositivo médico que a continuación se coloca en una ubicación diana deseada dentro del organismo, tras lo cual, el donante de NO se eluye desde el dispositivo médico. Como se usa en el presente documento, "dispositivo médico" se refiere a un dispositivo que se introduce de forma temporal o permanente en un mamífero para la profilaxis o terapia de una afección médica. Estos dispositivos incluyen cualquiera que se pueda introducir por vía subcutánea, por vía percutánea o por vía quirúrgica para reposar dentro de un órgano, tejido o lumen. Los dispositivos médicos incluyen, pero no se limitan a, endoprótesis vasculares, injertos sintéticos, válvulas cardiacas artificiales, corazones artificiales y conexiones para conectar la prótesis orgánica a la circulación vascular, válvulas venosas, injertos de aneurisma aórtico abdominal (AAA), filtros de la vena cava inferior, catéteres incluyendo catéteres permanentes de infusión de fármaco, bobinas embólicas, materiales embólicos usados en embolización vascular (por ejemplo, espumas de PVA), materiales para reparación de mallas, placas metálicas ortopédicas de partículas vasculares Dracon, varillas y tornillos y suturas vasculares.

El dispositivo médico tal como una endoprótesis vascular o injerto se puede revestir con una matriz. La matriz usada para revestir la endoprótesis vascular o injerto de acuerdo con la presente invención se puede preparar a partir de la diversidad de materiales. Un primer requisito para la matriz es que sea lo suficientemente elástica y flexible para permanecer sin romperse en las superficies expuestas de la endoprótesis vascular o de injerto sintético.

5

## 5. Administración de Liberación Controlada/Extendida/Sostenida/Prolongada

(1) También se desvelan métodos para tratar pacientes con insuficiencia cardiaca mediante la administración de un donante de NO a un paciente, que tiene un genotipo de polimorfismo de tipo silvestre homocigoto, como una formulación de liberación controlada. Como se usa en el presente documento, los términos liberación "controlada", "extendida", "sostenida", o "prolongada" de la composición de la presente invención de forma colectiva harán referencias en el presente documento a "liberación controlada", e incluyen liberación continua o discontinua, y lineal o no lineal de la composición en diversas realizaciones.

## 15 C. Dosificaciones

La cantidad de un donante de NO (por ejemplo, LA-419) que se administra o prescribe al paciente puede ser de aproximadamente, al menos aproximadamente, o como máximo aproximadamente 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500 mg, o cualquier intervalo derivable de los mismos. Como alternativa, la cantidad administrada o prescrita puede ser de aproximadamente, al menos aproximadamente o como máximo aproximadamente 0,001, 0,002, 0,003, 0,004, 0,005, 0,006, 0,007, 0,008, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0 mg/kg, o cualquier intervalo derivable de los mismos, con respecto al peso del paciente.

30 Cuando se proporciona en una cantidad discreta, cada ingesta del donante de NO se puede considerar una "dosis". Un experto en medicina puede prescribir o administrar múltiples dosis del donante de NO con respecto a un transcurso del tiempo en particular (régimen de tratamiento) o de forma indefinida.

35 El donante de NO se puede administrar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, o más veces o cualquier intervalo derivable de los mismos. Se contempla adicionalmente que el fármaco se puede ingerir durante un período de tiempo indefinido o sentir cuando el paciente presente síntomas de la afección médica para la que se prescribió o se administró un donante de NO. Además, el fármaco se puede administrar cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 horas, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días, o 1, 2, 3, 4, 5 semanas, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses o más, o cualquier intervalo derivable de los mismos. Como alternativa, se puede administrar por vía sistémica durante cualquier período de tiempo mencionado y se puede prolongar más allá de un año. En ciertas realizaciones, el fármaco se administra al o por el paciente una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces al día, o cuando sea necesario.

## 45 D. Otras Opciones Terapéuticas

En el presente documento se desvela que algunos métodos pueden implicar el tratamiento del paciente con un donante de NO que no es LA-419 o que es un diurético, ACE-I, antagonista de AII, beta-bloqueador, BNP, bloqueador de Ca<sup>++</sup>, o un inhibidor de HDAC. Como alternativa, un donante de NO diferente distinto de LA-419 se puede usar para tratar al paciente. Estos agentes se pueden prescribir para o se pueden administrar por o al paciente en lugar de o además de un donante de NO después de evaluar el polimorfismo(s) de NOS3.

55 Como un segundo régimen terapéutico, el agente se puede administrar o ingerir al mismo tiempo que LA-419, o ya sea antes o después de LA-419. El tratamiento puede mejorar uno o más síntomas de la enfermedad o afección cardiovascular tal como proporcionando un aumento de la capacidad de ejercicio, aumento del volumen de eyección cardiaca, disminución de la presión diastólica final del ventrículo izquierdo, disminución de la presión de la cuña capilar pulmonar, aumento del rendimiento cardiaco o del índice cardiaco, disminución de las presiones arteriales pulmonares, disminución de las dimensiones sistólica y diastólica terminales del ventrículo izquierdo, disminución del estrés de la pared ventricular izquierda y derecha, disminución de la tensión de la pared y grosor de la pared, aumento de la calidad de vida, y disminución de la morbilidad y la mortalidad relacionadas con la enfermedad.

60 También se desvela el uso de un donante de NO en combinación con otras modalidades terapéuticas. Por lo tanto, además de las terapias descritas anteriormente, también se pueden proporcionar al paciente más terapias cardiacas farmacéuticas "convencionales". Algunos ejemplos de otras terapias incluyen, sin limitación, agentes beta bloqueadores, antihipertensivos, cardiotónicos, anti-trombóticos, vasodilatadores, antagonistas de hormonas, inótropos, diuréticos, antagonistas de endotelina, bloqueadores de los canales de calcio, inhibidores de fosfodiesterasa, inhibidores de ACE, antagonistas de tipo 2 de angiotensina y bloqueadores/inhibidores de citoquina, e

65

inhibidores de HDAC.

Las combinaciones se pueden conseguir mediante la puesta en contacto de células cardíacas con una única composición o formulación farmacológica que incluye los dos agentes o mediante la puesta en contacto de la célula con dos composiciones o formulaciones distintas, al mismo tiempo, en la que una composición incluye la construcción de expresión y la otra incluye el agente. Como alternativa, la terapia con el uso de un donante de NO tal como LA-419 puede preceder o seguir a la administración del otro agente(s) en intervalos que varían de minutos a semanas. En las realizaciones en las que el otro agente y la construcción de expresión se administran por separado a la célula, por lo general sería necesario asegurarse de que no transcurre un periodo de tiempo significativo entre el tiempo de cada administración, de modo que el agente y la construcción de expresión aún podrían ser capaces de ejercer un efecto combinado de forma ventajosa sobre la célula. En tales casos, por lo general se contempla se podría poner en contacto la célula con las dos modalidades dentro de un plazo de aproximadamente 12-24 horas entre ambas y más preferentemente, dentro de un plazo de aproximadamente 6-12 horas entre ambas, con un tiempo de retraso de solo aproximadamente 12 horas siendo el más preferente. En algunas situaciones, puede ser deseable prolongar el periodo de tiempo del tratamiento de forma significativa, sin embargo, con lapsos de varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8) entre las respectivas administraciones.

También se puede concebir el deseo de más de una administración de cualquiera de LA-419, o del otro agente. En este sentido, se pueden usar diversas combinaciones. A modo de ilustración, cuando LA-419 es "A" y el otro agente es "B", las siguientes permutaciones basadas en 3 y 4 administraciones en total se usan a modo de ejemplo:

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

Del mismo modo se contemplan otras combinaciones.

## 1. Agentes Terapéuticos Farmacológicos

Algunos agentes terapéuticos farmacológicos y métodos de administración, dosificaciones, etc., son bien conocidos por los expertos en la materia (véanse, por ejemplo, "Physicians Desk Reference", "The Pharmacological Basis of Therapeutics" de Klaassen, "Remington's Pharmaceutical Sciences", y "The Merck Index, Eleventh Edition", y se pueden combinar con la invención a la vista de las divulgaciones en el presente documento. Necesariamente se producirá alguna variación en la dosificación, dependiendo del estado del sujeto que se está tratando. En cualquier caso, la persona responsable de la administración determinará la dosis apropiada para el sujeto individual y tales determinaciones individuales están dentro de las capacidades de los expertos habituales en la materia.

Algunos ejemplos no limitantes de un agente terapéutico farmacológico que se puede usar en la presente invención incluyen un agente antihiperlipoproteínico, un agente antiarterioesclerótico, un agente antitrombótico/fibrinolítico, un coagulante sanguíneo, un agente antiarrítmico, un agente antihipertensivo, un vasopresor, un agente para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva, un agente antianginoso, un agente antibacteriano o una combinación de los mismos.

### a. Agentes Antihiperlipoproteínicos

En ciertas realizaciones, la administración de un agente que reduce la concentración de uno más lípidos y/o lipoproteínas de la sangre, conocido en el presente documento como "agente antihiperlipoproteínico", se puede combinar con una terapia cardiovascular de acuerdo con la presente invención, en particular en el tratamiento de aterosclerosis y engrosamientos o bloqueos de tejidos vasculares. En ciertos aspectos, un agente antihiperlipoproteínico puede comprender un derivado de ácido ariloxialcanoico/fibrico, un secuestrador de resina/ácido biliar, un inhibidor de la HMG CoA reductasa, un derivado de ácido nicotínico, una hormona tiroidea o un análogo de hormona tiroidea, un agente misceláneo o una combinación de los mismos.

#### (1) Derivados de Ácido Ariloxialcanoico/Ácido Fibrico

Algunos ejemplos no limitantes de ácido ariloxialcanoico/fibrico incluyen beclobrato, enzafibrato, binifibrato, ciprofibrato, clinofibrato, clofibrato (atromide-S), ácido clofibrico, etofibrato, fenofibrato, gemfibrozilo (lobid), nicofibrato, pirifibrato, ronifibrato, simfibrato y teofibrato.

#### (2) Secuestradores de Resinas/Ácido Biliar

Algunos ejemplos no limitantes de secuestradores de resinas/ácido biliar incluyen colestiramina (cholybar, questran), colestipol (colestid) y polidexida.

(3) Inhibidores de la HMG CoA Reductasa

Algunos ejemplos no limitantes de inhibidores de la HMG CoA reductasa incluyen lovastatina (mevacor) , pravastatina (pravochole) o simvastatina (zocor).

5

(4) Derivados de Ácido Nicotínico

Algunos ejemplos no limitantes de derivados de ácido nicotínico incluyen nicotinato, acepimox, niceritrol, nicoclonato, nicomol y ácido oxiniácico.

10

(5) Hormonas Tiroideas y Análogos

Algunos ejemplos de hormonas tiroideas y análogos de las mismas incluyen etoroxato, ácido tiroprópico y tiroxina.

15

(6) Diversos Agentes Antihiperlipoproteínemicos

Algunos ejemplos no limitantes de diversos agentes antihiperlipoproteínemicos incluyen acifranol, azacosterol, benfluorex, β-benzalbutiramida, carnitina, sulfato de condroitina, clomestrona, detaxtrano, dextranosulfato sódico, ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico, eritadenina, furazabol, meglutol, melinamida, mitatrienodiol, ornitina, γ-orizanol, pantetina, tetraacetato de pentaeritrol, α-fenilbutiramida, pirozadilo, probucol (lorelco), β-sitosterol, sal de piperazina del ácido sultosilico, tiadenol, triparanol y xembucina.

20

**b. Antiarteroscleróticos**

Algunos ejemplos no limitantes de un agente antiarteriosclerótico incluyen carbamato de piridinol.

25

**c. Agentes Antitrombóticos/Fibrinolíticos**

También se desvela que la administración de un agente que ayuda en la eliminación o la prevención de coágulos sanguíneos se puede combinar con la administración de un modulador, en particular en el tratamiento de aterosclerosis y bloqueos de la vasculatura (por ejemplo, arterial). Algunos ejemplos no limitantes de agentes antitrombóticos y/o fibrinolíticos incluyen anticoagulantes, antagonistas de anticoagulantes, agentes antiplaquetarios, agentes trombolíticos, antagonistas de agentes trombolíticos o combinaciones de los mismos.

30

En ciertos aspectos, son preferentes los agentes antitrombóticos que se pueden administrar por vía oral, tales como, por ejemplo, aspirina y warfarina (coumadin).

35

(1) Anticoagulantes

Un ejemplo no limitante de un anticoagulante incluye acenocumarol, ancrodol, anisindiona, bromindiona, clorindiona, cumetarol, ciclocumarol, dextranosulfato sódico, dicumarol, difenadiona, biscumacetato de etilo, etilidencumarol, fluidiona, heparina, hirudina, liapolato sódico, oxazidiona, polisulfato de pentosán, fenindiona, fenprocumona, fosvitina, picotamida, tiocloamarol y warfarina.

40

(2) Agentes Antiplaquetarios

Algunos ejemplos no limitantes de agentes antiplaquetarios incluyen aspirina, un dextrano, dipiridamol (persantin), heparina, sulfinpirazona (anturane) y ticlopidina (ticlid).

45

(3) Agentes Trombolíticos

Algunos ejemplos no limitantes de agentes trombolíticos incluyen activador de plasminógeno tisular (activase), plasmína, pro-uroquinasa, uroquinasa (abbokinase), estreptoquinasa (streptase), anistreplasha/APSAC (eminase).

50

**d. Coagulantes Sanguíneos**

Se desvela que si un paciente padece una hemorragia o un aumento de la probabilidad de hemorragia, se puede usar un agente que puede aumentar la coagulación sanguínea. Algunos ejemplos no limitantes un agente estimulante de la coagulación sanguínea incluyen antagonistas de agentes trombolíticos y antagonistas de anticoagulantes.

60

(1) Antagonistas Anticoagulantes

Algunos ejemplos no limitantes de antagonistas anticoagulantes incluyen protamina y vitamina K1.

65

## (2) Antagonistas de Agente Trombolítico y Antitrombóticos

Algunos ejemplos no limitantes de antagonistas de agente trombolítico incluyen ácido aminocaproico (amicar) y ácido tranexámico (amstat). Algunos ejemplos no limitantes de antitrombóticos incluyen anagrelida, argatrobán, cilostazol, daltrobán, defibrotida, enoxaparina, fraxiparina, indobufeno, lamoparán, ozagrel, picotamida, plafibrida, tedelparina, ticlopidina y triflusal.

**e. Agentes Antiarrítmicos**

Algunos ejemplos no limitantes de agentes antiarrítmicos incluyen agentes antiarrítmicos de Clase I (bloqueadores de canales de calcio), agentes antiarrítmicos de Clase II (bloqueadores beta-adrenérgicos), agentes antiarrítmicos de Clase III (fármacos prolongadores de la repolarización), agentes antiarrítmicos de Clase IV (bloqueadores de canales de calcio) y diversos agentes antiarrítmicos.

## 15 (1) Bloqueadores de Canales de Calcio

Algunos ejemplos no limitantes de bloqueadores de canales de calcio incluyen agentes antiarrítmicos de Clase IA, de Clase IB y de Clase IC. Algunos ejemplos no limitantes de agentes antiarrítmicos de Clase IA incluyen dispiramida (norpace), procainamida (pronestil) y quinidina (quinidex). Algunos ejemplos no limitantes de agentes antiarrítmicos de Clase IB incluyen lidocaína (xilocaína), tocainida (tonocard) y mexiletina (mexitilo). Algunos ejemplos no limitantes de agentes antiarrítmicos de Clase IC incluyen encainida (enkaid) y flecainida (tambocor).

## (2) Beta Bloqueadores

Algunos ejemplos no limitantes de un beta bloqueador, conocido de otro modo como un bloqueador  $\beta$ -adrenérgico, un antagonista  $\beta$ -adrenérgico o un agente antiarrítmico de la Clase II, incluyen acebutolol (sectral), alprenolol, amosulalol, arotinolol, atenolol, befunolol, betaxolol, bevantolol, bisoprolol, bopindolol, bucindolol, bucumolol, bufetolol, bufuralol, bunitrolol, bupranolol, clorhidrato de butidrina, butofilolol, carazolol, carteolol, carvedilol, celiprolol, cetamolol, cloranolol, dilevalol, epanolol, esmolol (brevibloc), indenolol, labetalol, levobunolol, mepindolol, metipranolol, metoprolol, moprolol, nadolol, nadoxolol, nifenalol, nipradilol, oxprenolol, penbutolol, pindolol, practolol, pronetalol, propanolol (inderal), sotalol (betapace), sulfinalol, talinolol, tertatolol, timolol, toliprolol y xibinolol. En ciertos aspectos, el beta bloqueador comprende un derivado de ariloxipropanolamina. Algunos ejemplos no limitantes de derivados de ariloxipropanolamina incluyen acebutolol, alprenolol, arotinolol, atenolol, betaxolol, bevantolol, bisoprolol, bopindolol, bunitrolol, butofilolol, carazolol, carteolol, carvedilol, celiprolol, cetamolol, epanolol, indenolol, mepindolol, metipranolol, metoprolol, moprolol, nadolol, nipradilol, oxprenolol, penbutolol, pindolol, propanolol, talinolol, tertatolol, timolol y toliprolol.

## (3) Agentes Prolongadores de la Repolarización

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

## (4) Bloqueadores/Antagonistas de Canales de Calcio

Algunos ejemplos no limitantes de un bloqueador de canales de calcio, conocidos de otro modo como agentes antiarrítmicos de Clase IV, incluyen una arilalquilamina (por ejemplo, bepridilo, diltiazem, fendilina, gallopamilo, prenilamina, terodilina, verapamilo), un derivado de dihidropiridina (felodipina, isradipina, nicardipina, nifedipina, nimodipina, nisoldipina, nitrendipina), un derivado de piperazina (por ejemplo, cinarizina, flunarizina, lidoflazina) o un bloqueador de diversos canales de calcio tal como benciclano, etafenona, magnesio, mibefradilo o perhexilina. En ciertas realizaciones, un bloqueador de canales de calcio comprende un antagonista de calcio de dihidropiridina (de tipo nifedipina) de acción prolongada.

## (5) Diversos Agentes Antiarrítmicos

Algunos ejemplos no limitantes de diversos agentes antiarrítmicos incluyen adenosina (adenocard), digoxina (lanoxin), acecainida, ajmalina, amoproxán, aprindina, tosilato de bretilio, bunaftina, butobendina, ácido capobénico, cifenlina, disopiranida, hidroquinidina, indecainida, bromuro de ipatropio, lidocaína, lorajmina, lorcainida, meobentina, moricizina, pirmenol, prajmalina, propafenona, pirinolina, poligalacturonato de quinidina, sulfato de quinidina y viquidilo.

**f. Agentes Antihipertensivos**

Algunos ejemplos no limitantes de agentes antihipertensivos incluyen agentes simpato líticos, alfa/beta bloqueadores, alfa bloqueadores, agentes anti-angiotensina II, beta bloqueadores, bloqueadores de canales de calcio, vasodilatadores y diversos agentes antihipertensivos.

## (1) Alfa Bloqueadores

Algunos ejemplos no limitantes de un alfa bloqueador, también conocido como un bloqueador  $\alpha$ -adrenérgico o un antagonista  $\alpha$ -adrenérgico, incluyen amosulalol, arotinolol, dapiprazol, doxazosina, mesilatos de ergoloides, fenspirida, indoramina, labetalol, nicergolina, prazosina, terazosina, tolazolina, trimazosina e yohimbina. En ciertas realizaciones, un alfa bloqueador puede comprender un derivado de quinazolina. Algunos ejemplos no limitantes de derivados de quinazolina incluyen alfuzosina, bunazosina, doxazosina, prazosina, terazosina y trimazosina.

## (2) Alfa/Beta Bloqueadores

Se desvela que un agente antihipertensivo es un antagonista tanto alfa como beta adrenérgico. Algunos ejemplos no limitantes de un alfa/beta bloqueador comprenden labetalol (normodyne, trandate).

## (3) Agentes Anti-Angiotensina II

Algunos ejemplos no limitantes de agentes anti-angiotensina II incluyen inhibidores de enzima convertidora de angiotensina y antagonistas de receptores de angiotensina II. Algunos ejemplos no limitantes de inhibidores de enzima convertidora de angiotensina (inhibidores de ACE) incluyen alaceprilo, enalapril (vasotec), captoprilo, cilazapril, delapril, enalaprilat, fosinopril, lisinopril, moveltopril, perindopril, quinapril y ramipril. Algunos ejemplos no limitantes de un bloqueador de receptor de angiotensina II, también conocido como antagonista del receptor de angiotensina II, un bloqueador del receptor de ANG o un bloqueador del receptor de tipo 1 de ANG-II (ARBS), incluyen angiocandesartán, eprosartán, irbesartán, losartán y valsartán.

## (4) Simpatolíticos

Algunos ejemplos no limitantes de un agente simpatolítico incluyen un agente simpatolítico de acción central o un agente simpatolítico de acción periférica. Algunos ejemplos no limitantes de un agente simpatolítico de acción central, también conocido como un agente simpatolítico del sistema nervioso central (SNC), incluyen clonidina (catapres), guanabenz (wytensin), guanfacina (tenex) y metildopa (aldomet). Algunos ejemplos no limitantes de un agente simpatolítico de acción periférica incluyen un agente de bloqueo de ganglios, un agente de bloqueo de neuronas adrenérgico, un agente de bloqueo  $\beta$ -adrenérgico o un agente de bloqueo alfa 1-adrenérgico. Algunos ejemplos no limitantes de un agente de bloqueo de ganglios incluyen mecamilamina (inversine) y trimetafán (arfonad). Algunos ejemplos no limitantes de un agente de bloqueo de neuronas adrenérgico incluyen guanetidina (ismelin) y reserpina (serpasilo). Algunos ejemplos no limitantes de un bloqueador  $\beta$ -adrenérgico incluyen acenitrol (sectral), atenolol (tenormin), betaxolol (kerlone), carteolol (cartrol), labetalol (normodyne, trandate), metoprolol (lopressor), nadanol (corgard), penbutolol (levatol), pindolol (visken), propranolol (inalderal) y timolol (blocadren). Algunos ejemplos no limitantes de bloqueador alfa 1-adrenérgico incluyen prazosina (minipress), doxazocina (cardura) y terazosina (hytrin).

## (5) Vasodilatadores

Se desvela que un agente terapéutico cardiovascular puede comprender un vasodilatador (por ejemplo, un vasodilatador cerebral, un vasodilatador coronario o un vasodilatador periférico). En ciertas realizaciones preferentes, un vasodilatador comprende un vasodilatador coronario. Algunos ejemplos no limitantes de un vasodilatador coronario incluyen amotrifeno, bendazol, hemisuccinato de benfurodilo, benziodarona, cloracizina, cromona, clobenfurol, clonitrato, dilazep, dipiridamol, droprenilamina, efloxato, tetranitrano de eritritilo, etafenona, fendilina, floedilo, ganglefeno, herestrol bis( $\beta$ -dietilaminoetil éter), hexobendina, tosilo de itramina, kelina, LA-4195, lidoflanina, hexanitranato de manitol, medibazina, nicorglicerina, tetranitrato de pentaeritritol, pentritinol, perhexilina, pimefilina, trapidilo, tricromilo, trimetazidina, fosfato de trolnitrato y visnadina.

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

## (6) Diversos Antihipertensivos

Algunos ejemplos no limitantes de diversos antihipertensivos incluyen ajmalina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, bufenioda, cicletainina, ciclosidomina, un tanato de criptenamina, fenoldopam, flosequinán, ketanserina, mebutamato, mecamilamina, metildopa, metil 4-piridil cetona tiosemicarbazona, muzolimina, pargilina, pempidina, pinacidilo, piperóxán, primaperona, una protoveratrina, raubasina, rescimetol, rilmenideno, saralasin, nitroprusiato sódico, ticrinafeno, camsilato de trimetafano, tirosinasa y urapidilo.

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

**Derivados de Arletanolamina.** Algunos ejemplos no limitantes de derivados de arletanolamina incluyen amosulalol, bufuralol, dilevalol, labetalol, pronetalol, sotalol y sulfinalol.

5 **Derivados de Benzotiadiazina.** Algunos ejemplos no limitantes de derivados de benzotiadiazina incluyen altizida, bendroflumetiazida, benzotiazida, bencilhidroclorotiazida, butiazida, clorotiazida, clortalidona, ciclopentiazida, ciclotiazida, diazóxido, epitiazida, etiazida, fenquizona, hidroclorotizida, hidroflumetizida, meticloctiazida, meticrane, metolazona, paraflutizida, politizida, tetraclormetiazida y triclormetiazida.

10 **Derivados de N-carboxialquil(péptido/lactama).** Algunos ejemplos no limitantes de derivados de N-carboxialquil(péptido/lactama) incluyen alaceprilo, captoprilo, cilazapril, delapril, enalapril, enalaprilat, fosinopril, lisinopril, moveltipril, perindopril, quinapril y ramipril.

15 **Derivados de Dihidropiridina.** Algunos ejemplos no limitantes de derivados de dihidropiridina incluyen amlodipina, felodipina, isradipina, nocardipina, nifedipina, nilvadipina, nisoldipina y nitrendipina.

**Derivados de Guanidina.** Algunos ejemplos no limitantes de derivados de guanidina incluyen betanidina, debrisoquina, guanabenz, guanacina, guanadrel, guanazodina, guanetidina, guanfacina, guanoclor, guanoxabenz y guanoxano.

20 **Hidrazinas/Ftalazinas.** Algunos ejemplos no limitantes de hidrazinas/ftalazinas incluyen budralazina, cadralazina, dihidralazina, endralazina, hidracarbazina, hidralazina, feniprazina, pildralazina y todralazina.

25 **Derivados de Imidazol.** Algunos ejemplos no limitantes de derivados de imidazol incluyen clonidina, lofedina, fentolamina, tiamenidina y tolonidina.

**Compuestos de Amonio Cuaternario.** Algunos ejemplos no limitantes de compuestos de amonio cuaternario incluyen bromuro de azametonio, cloruro de clorisondamina, hexametonio, bis(metilsulfato) de pentacinio, bromuro de pentametonio, tartrato de pentolinio, cloruro de fenactropinio y metosulfato de trimetidinio.

30 **Derivados de Reserpina.** Algunos ejemplos no limitantes de derivados de reserpina incluyen bietaserpina, deserpidina, rescinnamina, reserpina y sirosingopina.

**Derivados de Sulfonamida.** Algunos ejemplos no limitantes de derivados de sulfonamida incluyen ambulida, clopamida, furosemida, indapamida, quinetazona, tripamida y xipamida.

35 (7) Vasopresores

Los vasopresores por lo general se usan para aumentar la presión sanguínea durante un shock, que se puede producir durante un procedimiento quirúrgico. Algunos ejemplos no limitantes de un vasopresor, también conocido como un agente antihipotensivo, incluyen metilsulfato de amezinio, amida de angiotensina, dimetofrina, dopamina, etifelmina, etilefrina, gepefrina, metaraminol, midodrina, norepinefrina, foledrina y sinefrina.

#### g. Agentes de Tratamiento para Insuficiencia Cardíaca Congestiva

45 Algunos ejemplos no limitantes de agentes para el tratamiento de insuficiencia cardíaca congestiva incluyen agentes anti-angiotensina II, tratamiento de reducción postcarga-precarga, agentes diuréticos e inotrópicos.

(1) Reducción postcarga-precarga

50 También se desvela que un paciente animal que no puede tolerar un antagonista de angiotensina se puede tratar con una terapia de combinación. Una terapia de este tipo puede combinar la administración de hidralazina (apresolina) y dinitrato de isosorbida (isordil, sorbitrate).

55 (2) Diuréticos

Algunos ejemplos no limitantes de un agente diurético incluyen un derivado de tiazida o benzotiadiazina (por ejemplo, altiazida, bendroflumetiazida, benzotiazida, bencilhidroclorotiazida, butiazida, clorotiazida, clortalidona, clorotalidone, ciclopentiazida, epitiazida, etiazida, etiazida, fenquizona, hidroclorotiazida, hidroflumetiazida, meticloctiazida, meticrano, metolazona, paraflutizida, politizida, tetraclorometiazida, triclormetiazida), un agente organomercúrico (por ejemplo, clormerodrino, meralurida, mercamfamida, mercaptomerina sódica, ácido mercumalílico, mercumetilina dodio, cloruro mercurioso, mersalilo), una pteridina (por ejemplo, furtereno, triamtereno), purinas (por ejemplo, acefilina, 7-morfolinometilteofilina, pamobrom, proteobromo, teobromo), esteroides incluyendo antagonistas de aldosterona (por ejemplo, canrenona, oleandrina, espirolactona), un derivado de sulfonamida (por ejemplo, acetazolamida, ambulida, azosemida, bumetanida, butazolamida, cloraminofenamida, clofenamida, clopamida, clorexolona, difenilmetano-4,4'-disulfonamida, disulfamida, etoxzolamida, furosemida, indapamida, mefrusida, metazolamida, piretanida, quinetazona, torasemida, tripamida, xipamida), un uracilo (por ejemplo, aminometradina,

65

amisometradina), un antagonista moderador de potasio (por ejemplo, amiloridea, triamtereno) o diversos diuréticos tales como aminoquina, arbutina, clorazano, ácido etacrínico, etozolina, hidracarbazona, isosorbida, manitol, metocalcona, muzolimina, perhexilina, ticmafeno y urea.

5 (3) Agentes Inotrópicos

Algunos ejemplos no limitantes de un agente inotrópico positivo, también conocido como un cardiotónico, incluyen acefilina, una acetildigitoxina, 2-amino-4-picolina, amrinona, hemisuccinato de benfurodilo, bucladesina, cerberosina, camfotamida, convalatoxina, cimarina, denopamina, deslanosida, digitalina, digital, digitoxina, digoxina, dobutamina, dopamina, dopexamina, enoximona, eritrofleína, fenalcomina, gitalina, gitoxina, glicociamina, heptaminol, hidrastinina, ibopamina, un lanatóside, metamivam, milrinona, nerifolina, oleandrina, ouabaina, oxifedrina, prenalterol, proscillaridina, resibufogenina, escilareno, escilarenina, estrofantina, sulmazol, teobromina y xamoterol

En algunos aspectos en particular, un agente inotrópico es un glucósido cardíaco, un agonista beta-adrenérgico o un inhibidor de fosfodiesterasa. Algunos ejemplos no limitantes de glucósidos cardíacos incluyen digoxina (lanoxin) y digitoxina (crystodigin). Algunos ejemplos no limitantes de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos incluyen albuterol, bambuterol, bitolterol, carbuterol, clenbuterol, clorprenalina, denopamina, dioxetodrina, dobutamina (dobutrex), dopamina (intropin), dopexamina, efedrina, etafedrina, etilnorepinefrina, fenoterol, formoterol, hexoprenalina, ibopamina, isoetarina, isoproterenol, mabuterol, metaproterenol, metoxifenamina, oxifedrina, pirbuterol, procaterol, protokilol, reproterol, rimiterol, ritodrina, sotereno, terbutalina, tretoquinol, tulobuterol y xamoterol. Algunos ejemplos no limitantes de un inhibidor de fosfodiesterasa incluyen enoximona y amrinona (inocor)

(4) Agentes Antianginosos

Algunos agentes antianginosos pueden comprender organonitratos, bloqueadores de canales de calcio, beta bloqueadores y combinaciones de los mismos.

Algunos ejemplos no limitantes de organonitratos, también conocidos como nitrovasodilatadores, incluyen nitroglicerina (nitro-bid, nitrostat), dinitrato de isosorbida (isordil, sorbitrate) y nitrato de amilo (aspirol, vaporole).

**2. Agentes Terapéuticos Quirúrgicos**

En ciertos aspectos, el agente terapéutico secundario puede comprender una cirugía de algún tipo que incluye, por ejemplo, cirugía preventiva, de diagnóstico o de estadificación, curativa y paliativa. La cirugía, y en particular la cirugía curativa, se puede usar en conjunto con otras terapias, tales como las desveladas en la presente invención y uno o más agentes adicionales.

Tales agentes terapéuticos quirúrgicos para enfermedades y trastornos vasculares y cardiovasculares son bien conocidos por los expertos en la materia y pueden comprender, pero no se limitan a, la realización de cirugía en un organismo, colocación de prótesis mecánicas cardiovasculares, angioplastia, reperfusión de la arteria coronaria, ablación con catéter, colocación de un desfibrilador cardioversor implantable al sujeto, soporte circulatorio mecánico o una combinación de los mismos. Algunos ejemplos no limitantes de un soporte circulatorio mecánico que se puede usar en la presente invención comprenden una contrapulsación con balón intraaórtico, un dispositivo auxiliar para el ventrículo izquierdo o una combinación de los mismos.

**IV. KITS**

Se desvelan kits para la detección de uno o más polimorfismos de NOS3. Se desvela que el polimorfismo está en la posición 894. Se desvela que los kits contienen reactivos específicos para la detección o análisis de ADN (por ejemplo, sondas o cebadores de oligonucleótido). Se desvela que los kits contienen todos los componentes necesarios para realizar un ensayo de detección, incluyendo todos los controles, direcciones para la realización de ensayos, y cualquier software necesario para análisis y presentación de resultados. Se desvela que se proporcionan algunas sondas y reactivos individuales para detección de polimorfismos de NOS3 como reactivos específicos de analito. Se desvela que los kits se proporcionan como agentes de diagnóstico *in vitro*.

**V. Ejemplos**

Los siguientes ejemplos se proporcionan con la finalidad de ilustración de diversas realizaciones de la invención y no pretenden limitar la presente invención en modo alguno. Un experto en la materia observará rápidamente que la presente invención se adapta bien para realizar los objetos y obtener los fines y las ventajas mencionadas, así como los objetos, finales y ventajas inherentes en el presente documento.

**EJEMPLO 1****COMPARACIÓN DE LA-419 E ISDN****5 Donantes y cultivos celulares**

Se aislaron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) en cultivos primarios y se adquirieron como células proliferantes de Clonetics (San Diego, California). Todos los donantes de cultivo celular eran sanos, sin complicaciones durante el embarazo ni prenatales. Las células cultivadas se incubaron en aire al 95 % / CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C y se pasaron por un procedimiento enzimático (tripsina). Las células confluentes (4 a 5 x 10<sup>5</sup> células por placa de 35 mm) se colocaron con medio esencial mínimo que contenía L-arginina 3 mM y BH<sub>4</sub> 0,1 mM [(6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina]. Antes de los experimentos, las células (del segundo o tercer paso) se aclararon dos veces con tampón Tyrode-HEPES con CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM. ISDN se obtuvo de Sigma-Aldrich.

**15 Medición de Niveles de NO y ONOO<sup>-</sup>**

Las mediciones concurrentes de NO y ONOO<sup>-</sup> se llevaron a cabo con nanosensores electroquímicos en tándem combinados en una unidad de trabajo con un diámetro total de 200-500 nm (FIG. 1). Su diseño se basó en la tecnología de fibra de carbono modificada químicamente bien caracterizada y desarrollada anteriormente (Malinski y Taha, 1992; Lvovich y Scheeline, 1997). Cada uno de los nanosensores se preparó por deposición de un material sensor en la punta de una fibra de carbono (longitud de 4-5 µm, diámetro de 0,2-0,5 µm). Las fibras se sellaron con epoxi no conductor y se conectaron eléctricamente a hilos de cobre con epoxi de plata conductor. Se usaron una película conductora de tetraquis(3-metoxi-4-hidroxifenil)porfirina de níquel (II) polimérica para el sensor de NO y una película polimérica de [2.2] paraciclofenilporfirina de Mn (III) para el sensor de ONOO<sup>-</sup>.

Se aplicaron un módulo de nanosensores de NO/ONOO<sup>-</sup> (diámetro de 1-2 µm) con un contraelectrodo de alambre de platino (0,1 mm) y un electrodo de referencia de calomelanos saturado (SCE). Se realizaron voltimetría de pulso diferencial (DPV) y amperimetría con un potencióstato de múltiples canales Gamry VFP600 basado en computadora. DPV se usó para medir las concentraciones basales de NO y ONOO<sup>-</sup>, y la amperimetría se usó para medir los cambios en las concentraciones de NO y ONOO<sup>-</sup> desde su nivel basal con el tiempo. La corriente de DPV en el potencial de pico característico para la oxidación de NO (0,65 V) y la reducción de ONOO<sup>-</sup> (-0,45 V) fue directamente proporcional a las concentraciones locales de estos compuestos en la proximidad inmediata del sensor. Se construyeron curvas de calibración lineales (corriente frente a concentración) para cada sensor de 10 nM a 3 µM antes y después de las mediciones con alícuotas de soluciones patrón de NO y ONOO<sup>-</sup>, respectivamente. El límite de detección de los sensores fue 1,0 nM.

La cuantificación de cada analito (concentración en nM) se llevó a cabo usando una corriente máxima para amperogramas y curvas de calibración patrón. La reproducibilidad de las mediciones con nanosensores es relativamente alta (entre un 5-12 %). El módulo de nanosensores de NO/ONOO<sup>-</sup> se bajó con la ayuda de un micromanipulador controlado por computadora hasta que alcanzó la superficie de la membrana de la célula (en este punto, se observó una pequeña señal piezoeléctrica, 0,1-0,2 pA, de 1-3 milisegundos de duración). Los sensores se elevaron lentamente 5 ± 2 µm desde la superficie de la célula endotelial individual. A continuación se añadieron el agonista de eNOS, ionóforo de calcio A23187 (Cal) así como los diferentes fármacos al medio circundante en la superficie celular con un nanoinyector que también se colocó mediante un micromanipulador controlado por computadora.

La preparación de HUVEC es estable a lo largo del curso de estos experimentos permaneciendo las células viables en cultivo durante > 24 horas. En condiciones sin estimulación, los niveles basales de liberación de NO son muy bajos (< 30 nM). Se llevó a cabo la medición de la liberación de NO en función del tratamiento en células endoteliales individuales. Se pueden llevar a cabo múltiples mediciones de liberación de NO en células individuales después de un breve período refractario. Para un análisis estadístico robusto, se usaron células distintas para cada concentración y tipo de fármaco usados en estos análisis.

**Resultados**

Se realizó una comparación de los efectos de ISDN frente a LA-419 en la liberación de NO y ONOO<sup>-</sup> endotelial dependiente de donantes de raza blanca y afroamericana. La exposición de células endoteliales humanas a ISDN durante un período prolongado de tiempo (12 h) tiene efectos perjudiciales en su capacidad para generar NO mientras que causa un aumento concomitante de estrés nitrooxidativo. Estos efectos adversos de un donante convencional de NO en la función endotelial pueden contribuir a los mecanismos de tolerancia y aumento de riesgo para enfermedad aterotrombótica. El tratamiento previo de las células con ISDN dio como resultado un aumento pronunciado en la liberación de NO de un 11 % (individuos de raza blanca no hispana) y un 12 % (individuos de raza afroamericana) mientras que disminuyeron los niveles de ONOO<sup>-</sup> en un 16 % (individuos de raza blanca) y un 18 % (individuos de raza afroamericana) (FIG. 2-3). Estos efectos dieron como resultado un efecto global *adverso* de ISDN en la función de eNOS que se evidencia mediante una disminución de la proporción NO/ONOO<sup>-</sup> en un 23 % (individuos de raza blanca no hispana, p < 0,01) y un 25 % (individuos de raza afroamericana, p < 0,05), como se muestra en la FIG. 4. Por el

contrario, el tratamiento con LA-419 causó un *incremento* opuesto y pequeño en la liberación de NO en HUVEC tanto para individuos de raza blanca no hispana como para individuos de raza afroamericana en condiciones idénticas (FIG. 2-3). En comparación con ISDN, la proporción NO/ONOO<sup>-</sup> no fue significativamente diferente de las muestras de control (FIG. 4), no interrumpiendo de ese modo la función de eNOS. Estos descubrimientos indican que ISDN tiene un efecto perjudicial en la función endotelial y los mecanismos de acoplamiento de eNOS de un modo que no se observó con LA-419, incluso en células de donantes de raza afroamericana como se muestra en la Tabla posterior:

Tratamientos	Individuos de raza blanca no hispana		Individuos de raza afroamericana	
	NO	ONOO <sup>-</sup>	NO	ONOO <sup>-</sup>
Control	384 ± 24	279 ± 9	245 ± 13	468 ± 29
LA-419	409 ± 30	307 ± 11	253 ± 15	532 ± 25
ISDN	343 ± 11	323 ± 9	218 ± 16	552 ± 11

Los valores son la media ± D.T. (unidades = nM)

Estos resultados de los análisis de los presentes inventores demuestran un efecto adverso de ISDN en la función endotelial que puede contribuir a los mecanismos de tolerancia con uso que no se observó con LA-419.

En estos experimentos, LA-419 se comparó de forma favorable frente a ISDN en su efecto en la biodisponibilidad de NO endotelial dependiente. De hecho, estos agentes tienen efectos opuestos en la función de eNOS en células de donantes de raza tanto blanca como afroamericana que correspondieron bien con el riesgo de CV. De ese modo, esta es una evidencia de que LA-419 produce menos tolerancia mientras que mantiene la función endotelial vascular en comparación con nitratos más antiguos tales como ISDN.

## EJEMPLO 2

### **EFFECTO DE VARIANTES DE eNOS CON LA-419**

Este ejemplo describe la respuesta específica de genotipo de las tres variantes principales de eNOS con concentraciones de 1 μM y 5 μM de LA-419. Los tres polimorfismos genéticos principales estudiados fueron la variante Glu298Asp (E298D o 894G→T) en el exón 7 del cromosoma 17, la variante - 786T→C en la región promotora, y el polimorfismo del intrón 4 (VNTR). Todas estas variantes tienen posibles efectos en la disfunción del sistema cardiovascular y endotelial. Para este estudio, se usaron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) de 50 donantes entre 18 y 32 años de edad.

Se emplearon diversas técnicas de análisis para los análisis. En primer lugar, se exploró el efecto del genotipo en la liberación de NO y ONOO<sup>-</sup> con diferentes concentraciones de LA-419 (control, 1 μM, 5 μM), calculado como la liberación de pico promedio (nmol/l) de NO, ONOO<sup>-</sup>, y NO/ONOO<sup>-</sup>. También se midió el efecto del genotipo en el aumento neto de NO, ONOO<sup>-</sup>, y NO/ONOO<sup>-</sup> para LA-419 (1 μM y 5 μM) en comparación con el control. Además, se realizó un análisis del efecto del genotipo en el % de cambio en la producción de NO, ONOO<sup>-</sup>, y NO/ONOO<sup>-</sup> para LA-419 (1 μM y 5 μM), calculado como:

$$\% \text{ de Cambio} = [(LA-419 \text{ promedio} - \text{control promedio}) / (\text{control promedio})] * 100$$

Finalmente, se realizó una evaluación sobre el efecto del genotipo en la producción de NO, ONOO<sup>-</sup>, y NO/ONOO<sup>-</sup> como el número de veces de diferencia del control para LA-419 (1 μM y 5 μM), calculado como:

$$\text{Número de veces de diferencia} = (LA-419 \text{ promedio}) / (\text{control promedio})$$

En cada técnica de cálculo, los resultados se compararon para significación estadística usando un ensayo de Rruskal-Wallace ANOVA no paramétrico o un ensayo U de Mann-Whitney no paramétrico. La significación estadística se estableció en un valor p < 0,05 en una distribución bilateral. Debido a de que la variabilidad experimento-experimento se reduce mediante la normalización de cada control de experimento, las mediciones del % de cambio o del número de veces de diferencia se consideran más robustas estadísticamente que los datos de aumento o distribución netos.

### ***Materiales y métodos***

#### **Mediciones de actividad de eNOS y abundancia de proteínas**

Igual que en el Ejemplo 1.

### Formación de genotipos de eNOS

Las tres variantes principales del gen eNOS (NOS 3) que tienen posibles efectos en el sistema cardiovascular son Glu298Asp (E298D o 894G>T) en el exón 7 del cromosoma 17, -786T>C en la región promotora y el intrón 4 (VNTR). Se usaron un millón de HUVEC suministradas por Elucida y enviadas congeladas para la extracción de ADN. Se usó el kit Illustra Tissue and Cells GenomicPrep Mini Spin de GE Healthcare para aislar el ADN para formación de genotipos.

### Polimorfismo Glu298Asp (G→T)

Este polimorfismo del exón 7 está asociado a infarto agudo de miocardio (AMI), aumento del riesgo de enfermedad cardíaca coronaria (CHD), espasmo coronario, aterosclerosis temprana, MI prematuro y aneurisma aórtico abdominal. Asp 298 (T894) está asociado a susceptibilidad a AMI, aterosclerosis carótida, CHD y MI reciente, CHD grave, aterosclerosis temprana, y angina vasoespástica coronaria (Napoli *et al.*, 2006). Todas estas afecciones tienen en común disfunción endotelial, y el alelo Asp 298 está asociado a disfunción endotelial incluso en voluntarios normales (Imamura *et al.*, 2004) así como en arterias coronarias humanas aisladas (Erbs *et al.*, 2006). No se ha determinado el mecanismo mediante el que el alelo Asp 298 ejerce estos efectos.

Los genotipos del exón 7 se identificaron mediante metodología de PCR-RFLP. Los cebadores usados fueron: directo, aaggcaggagacagtggatgga (SEQ ID NO: 5); inverso, cccagtcacatcccttggctgctca (SEQ ID NO: 6). Las condiciones de ciclado fueron 94 °C durante 4 minutos durante 1 ciclo; 94 °C durante 30 segundos, 65 °C durante 30 segundos, y 72 °C durante 1 minuto durante 35 ciclos; y 72 °C durante 5 minutos. La PCR fue seguida por una digestión con enzimas de restricción del producto de 258 pb usando Ban II para producir bandas de 162 y 85 pb que indican tipo silvestre homocigótico, 258, 163, y 85 pb indican un heterocigótico y un mutante homocigótico estaba sin cortar.

### Polimorfismo del promotor -786 T→C

Este polimorfismo de promotor está asociado a un desequilibrio de la actividad autónoma en CHD (Napoli *et al.*, 2006). T→C está asociado a enfermedad grave de la arteria carótida interna pero sin aterosclerosis temprana (Napoli *et al.*, 2006). Los portadores de CC han aumentado la disfunción endotelial debido a una menor generación de NO (Erbs *et al.*, 2006), que es probable que estimule aterosclerosis y aumente la formación de placa.<sup>2</sup>

Los genotipos del promotor también se identificaron mediante metodología de PCR-RFLP. Los cebadores usados fueron: directo, tggagagtgtgtgtaccacca (SEQ ID NO: 7); inverso, gcctccacccccaccctgtc (SEQ ID NO: 8). Las condiciones de ciclado fueron 94 °C durante 4 minutos durante 1 ciclo; 94 °C durante 30 segundos, 65 °C durante 30 segundos, y 72 °C durante 1 minuto durante 35 ciclos; y 72 °C durante 5 minutos. La PCR fue seguida por una digestión con enzimas de restricción del producto de 180 pb, usando MSP I para producir bandas de 140 y 40 pb que indican tipo silvestre homocigótico, 140, 90, 50, y 40 pb que indican un heterocigótico y un mutante homocigótico dio bandas de 90, 50, y 40 pb.

### Polimorfismo de intrón 4

Este polimorfismo de repetición en tándem variable ("4a/4b") también se puede asociar a síndromes coronarios agudos y CHD (Napoli *et al.*, 2006) debido a niveles inferiores de producción de NO (Li *et al.*, 2004).

Las variantes de intrón 4 se identificaron mediante PCR y electroforesis en gel. Los cebadores usados fueron: directo, aggccctatggtagtgccttt (SEQ ID NO: 9); inverso, tctctagtgtgtgtgtcac (SEQ ID NO: 10). Las condiciones de ciclado fueron 94 °C durante 4 minutos durante 1 ciclo; 94 °C durante 30 segundos, 63 °C durante 30 segundos, y 72 °C durante 1 minuto durante 35 ciclos; y 72 °C durante 5 minutos. El producto de tipo silvestre, 4b/4b, produjo un fragmento de 420 pb. Un heterocigoto (4b/4a) dio bandas de 420 y 393 pb. El mutante 4a/4a dio una banda de 393 pb; 4c/4c dio una banda de 447 pb t 4y/4y dio una banda de 339 pb.

## Resultados

**Efectos del genotipo en el grupo, mediciones de liberación de pico:** (grupo se define como control, LA-419 5 µM, y LA-419 1 µM)

Se evaluó el efecto del genotipo en la generación de NO, ONOO<sup>-</sup>, y NO/ONOO<sup>-</sup> mediante LA-419 que se midió mediante liberación de pico. Como se muestra en las tablas a1-a3, en el grupo de control (vehículo de LA-419 solo), no hubo ninguna diferencia significativa en los niveles de NO, ONOO<sup>-</sup> y NO/ONOO<sup>-</sup> entre las variantes del gen de cada polimorfismo. La tabla b1 demuestra un aumento en la liberación de pico de NO en respuesta a LA-419 (5 µM), en todos los genotipos. Se produjo un aumento menor en la liberación de pico de NO en respuesta a LA-419 1 µM (Tabla c1). Para la liberación de pico promedio, la generación de NO no fue significativamente diferente entre los genotipos en los tres sitios polimórficos, para cada concentración de LA-419.

Los niveles de producción de ONOO<sup>-</sup> no revelaron ninguna disminución clara en respuesta a LA-419 (1 µM) mientras que se detectó una disminución en la producción de ONOO<sup>-</sup> en respuesta a LA-419 5 µM (Tablas b2 y c2). No pareció

haber una disminución dependiente de dosis de genotipo en la liberación de pico de  $\text{ONOO}^-$  para ninguno de los polimorfismos.

5 También se examinaron los efectos de las combinaciones de genotipos en la liberación de pico de NO,  $\text{ONOO}^-$ , y  $\text{NO/ONOO}^-$  en los grupos. Para cada polimorfismo, se compararon los homocigotos de alelos mayoritarios con los portadores de alelos minoritarios (Tablas d-f). Ninguna de las medidas fue significativamente diferente entre los homocigotos de alelos mayoritarios y los portadores de alelos minoritarios, para cada dosis de LA-419.

10 Se examinaron los efectos del genotipo en la liberación de pico de NO,  $\text{ONOO}^-$ , y  $\text{NO/ONOO}^-$  para las combinaciones alélicas completas del exón 7 y las variantes de promotor (Tablas g-i). No hubo ninguna tendencia clara de una mayor liberación de pico de NO, disminución de la generación de  $\text{ONOO}^-$ , o mayor  $\text{NO/ONOO}^-$  en respuesta a LA-419 (5  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ ) para el exón 7 y la combinación de alelos mayoritarios de promotor (G/G + T/T) en comparación con otras combinaciones de genotipos individuales. También se examinó el efecto del genotipo en los niveles de NO,  $\text{ONOO}^-$ , y  $\text{NO/ONOO}^-$  para la variante de combinación de alelos mayoritarios G/G + T/T en comparación con la combinación de todas las demás variantes alélicas, Tablas j-l. No hubo ninguna diferencia entre la variante de combinación de alelos mayoritarios y los demás genotipos combinados, para ninguna medida de liberación de pico en cualquiera de las dosis de LA-419.

#### 20 **Efecto del genotipo en el aumento neto con respecto al control para LA-419 5 $\mu\text{M}$ y 1 $\mu\text{M}$**

El efecto del genotipo en el aumento neto de los niveles de NO,  $\text{ONOO}^-$ , y  $\text{NO/ONOO}^-$  para LA-419 (1  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$ ) con respecto al control se muestra en las Tablas m-n. Para la generación de NO en respuesta a LA-419 5  $\mu\text{M}$  (Tabla m1) existen tendencias no significativas de mayores cantidades asociadas a alelos mayoritarios de liberación neta de NO tanto para el exón 7 como para el polimorfismo de promotor. Esta posible respuesta dependiente de genotipo no se observa para LA-419 1  $\mu\text{M}$  (Tabla n1).

30 También se examinaron los efectos de las combinaciones de genotipos en el aumento neto de los niveles de NO,  $\text{ONOO}^-$ , y  $\text{NO/ONOO}^-$  para LA-419 (5  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ ) con respecto al control (Tablas o - p). Las variantes de genes de alelos mayoritarios para el exón 7 y el promotor comparadas con sus respectivos portadores de alelos minoritarios mostraron una tendencia (valores de p de 0,10 y 0,12) de un mayor (de un 22 % en cada caso) aumento neto de NO en respuesta a LA-419 5  $\mu\text{M}$  (Tabla o1). Además, se examinaron las combinaciones alélicas completas del exón 7 y los polimorfismos de promotor (Tablas q y r). En la Tabla q1 se puede observar que la variante de combinación de alelos mayoritarios, G/G + T/T, produjo un aumento neto numéricamente mayor, no significativo, de NO en respuesta a LA-419 5  $\mu\text{M}$  en comparación con las demás combinaciones alélicas individuales. Además, cuando se comparó la variante de alelos mayoritarios G/G + T/T con la combinación de todas las demás variantes alélicas permaneció el mayor aumento neto de NO en respuesta a LA-419 5  $\mu\text{M}$ , con una tendencia hacia la significación ( $p = 0,13$ , Tabla s1). No hubo ninguna diferencia significativa en el aumento neto de  $\text{ONOO}^-$  para LA-419 (1  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$ ) con respecto al control para cualquiera de las combinaciones de genotipos.

#### 40 **Efecto del genotipo y efecto de la raza en el % de cambio para LA-419 (5 $\mu\text{M}$ y 1 $\mu\text{M}$ )**

45 Los efectos de LA-419 en el % de cambio en comparación con el control se dan en las Tablas u1-3 (LA-419 5  $\mu\text{M}$ ) y v1-3 (LA-419 1  $\mu\text{M}$ ). Para LA-419 5  $\mu\text{M}$  el aumento del % en la generación de NO de pico varió de un 11,6 a un 17,4 %, entre los grupos de genotipos (Tabla u1). Para el polimorfismo G894T del exón 7, la generación de NO tendió a relacionarse directamente con la presencia de G, alelo mayoritario ( $p = 0,12$ ). De forma análoga, para la variante T-786C de promotor también hubo una tendencia ( $p = 0,22$ ) en la generación de NO que se relacionó con el alelo minoritario. El patrón de polimorfismo del intrón 4 no proporcionó ninguna evidencia de un efecto en la generación de NO. La generación de  $\text{OONO}^-$  no parece estar relacionada con ningún alelo de ninguno de los tres sitios polimórficos (Tabla u2). Hubo una tendencia no significativa en la proporción  $\text{NO/OONO}^-$  biológicamente importante de ser mayor en los homocigotos de alelos mayoritarios tanto del exón 7 como de los polimorfismos de promotor (Tabla u3), y en todos los genotipos el aumento en la proporción en respuesta a LA-419 5  $\mu\text{M}$  fue sustancial, variando de un 37-53 %. Para LA-419 1  $\mu\text{M}$  no hubo ninguna tendencia con el genotipo en el grado de generación de NO o mejora de  $\text{NO/OONO}^-$  (Tabla v1), que fue más variable y tendió a ser menor que para la concentración de 5  $\mu\text{M}$ .

55 Las Tablas x1 y x2 dan la medida derivada de la "proporción del % de cambio" para las medidas de producto de eNOS, calculada por división del % de cambio en NO por el % de cambio en  $\text{OONO}^-$ . Un valor positivo para esta proporción significa que cualquiera de los dos valores de NO y  $\text{OONO}^-$  fueron positivos o negativos, y los valores  $< 1,0$  significan que el % de disminución en  $\text{OONO}^-$  fue  $>$  el aumento en NO. Para LA-419 5  $\mu\text{M}$  (Tabla x1) todos los valores son negativos, lo que significa que para todos los grupos de genotipos en todos los polimorfismos, la generación de NO fue  $>$  control y  $\text{OONO}^-$  fue  $<$  control. Todas las proporciones fueron  $< 1,0$ , lo que indica un mayor grado de disminución de  $\text{OONO}^-$  que de aumento de generación de NO en todos los grupos. Los resultados para LA-419 1  $\mu\text{M}$  son más variables, reflejando la variabilidad en la generación tanto de NO como de  $\text{OONO}^-$ .

65 El efecto de la raza en el % de cambio en la generación de NO,  $\text{ONOO}^-$ , y  $\text{NO/ONOO}^-$  para la concentración de 5  $\mu\text{M}$  de LA-419 (Tablas u1-u3) demostró que los individuos de raza negra tendieron a tener niveles inferiores de generación de NO en comparación con las demás razas. Entre las razas autoidentificadas examinadas, los individuos de raza negra

tuvieron el menor % de cambio en la generación de NO y el menor % de reducción en ONOO<sup>-</sup>, dando como resultado el menor % de cambio en la proporción NO/ONOO<sup>-</sup> (Tablas *u1 - u3*). Aunque en los individuos de raza negra el % de cambio en NO no fue significativamente diferente ( $p = 0,66$ ), los % de cambio en ONOO<sup>-</sup> y NO/ONOO<sup>-</sup> fueron ambos significativos con  $p = 0,01$ . Estas tendencias dentro de la raza fueron consistentes en respuesta a la concentración de 1  $\mu\text{M}$  de LA-419 (Tablas *v1 - v3*), donde los individuos de raza negra fueron la única raza que demostró una disminución media en la generación de NO y la proporción de NO/OONO<sup>-</sup> (Tablas *v1 y v3*).

#### Efecto de las combinaciones de genotipos en el número de veces de diferencia para LA-419 (5 $\mu\text{M}$ y 1 $\mu\text{M}$ )

El análisis completo de los genotipos y las combinaciones de genotipos se presenta como valores de "Número de veces de diferencia", que da el mismo resultado que el % de cambio, igualando los valores ( $>1,0-1,0$ ) x 100 el % de aumento, e igualando los valores de ( $1,0-<1,0$ ) x 100 el % de disminución. Las Tablas *y1-3* y *z1-3* dan resultados (después de transformación) y valores  $p$  idénticos que los resultados de las Tablas *u1-3* y *v1-3*. Los efectos de las combinaciones de genotipos en el número de veces de diferencia de generación de NO, ONOO<sup>-</sup>, y NO/ONOO<sup>-</sup> para LA-419 se dan en las Tablas *aa-rr*.

En las Tablas *aa1-aa3* se compararon los homocigotos de alelos mayoritarios con los portadores de alelos minoritarios para cada polimorfismo para la respuesta a LA-419 5  $\mu\text{M}$ . En la comparación del exón 7, el homocigoto de alelos mayoritarios tuvo un aumento en el número de veces de producción de NO en comparación con los portadores de alelos minoritarios, de  $1,16 \pm 0,06$  frente a  $1,13 \pm 0,06$  ( $p = 0,05$ ). No hubo ninguna diferencia significativa en el porcentaje de control para la generación de ONOO<sup>-</sup> en respuesta a LA-419 5  $\mu\text{M}$  para el homocigoto de alelos mayoritarios en comparación con los portadores de alelos minoritarios en el exón 7 (Tabla *aa2*). Por consiguiente, el homocigoto de alelos mayoritarios para el exón 7 tuvo un mayor % de control para la proporción NO/ONOO<sup>-</sup> en respuesta a LA-419 (5  $\mu\text{M}$ ) en comparación con los portadores de alelos minoritarios,  $1,48 \pm 0,18$  frente a  $1,39 \pm 0,13$  ( $p = 0,042$ , Tabla *aa3*). Se exhibieron tendencias del mismo tipo en la comparación de variantes de promotor (Tablas *aa1- aa3*), pero con valores de  $p$  no significativos.

Los efectos del genotipo para las combinaciones alélicas completas del exón 7 y las variantes de promotor se dan en las Tablas *cc* y *dd*. No hubo una tendencia significativa en las respuestas de NO o ONOO<sup>-</sup> a LA-419 (para cualquiera de 5  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ ) que fuera mayor en la combinación de alelos dominantes (G/G + T/T) en comparación con todos los demás genotipos. De hecho, la combinación de homocigotos de alelos mayoritarios debilitó la significación estadística para los descubrimientos de LA-419 5  $\mu\text{M}$  en comparación con el genotipo G/G de alelos dominantes del exón 7 solo.

También se examinó el efecto del genotipo en el número de veces de diferencia para la variante de alelos mayoritarios G/G + T/T en comparación con la combinación de todas las demás variantes alélicas, dándose los resultados en las Tablas *ee* y *ff*. La combinación alélica dominante (G/G + T/T) tendió a tener un mayor número de veces de aumento para la producción de NO ( $p = 0,09$ ) y la proporción NO/ONOO<sup>-</sup> ( $p = 0,13$ ) en respuesta a LA-419 5  $\mu\text{M}$  (Tablas *ee1* y *ee3*), pero no mostró ninguna tendencia de tales efectos en respuesta a LA-419 1  $\mu\text{M}$  (Tablas *ff1* y *ff3*).

#### Efecto del genotipo en las respuestas al número de veces de diferencia de LA-419 en individuos de raza blanca

Se examinó el efecto del genotipo en el número de veces de diferencia de las respuestas de NO, ONOO<sup>-</sup>, y NO/ONOO<sup>-</sup> en individuos de raza blanca, presentándose los datos en las Tablas *gg-nn*. La Tabla *gg1* muestra que las variantes de alelos mayoritarios tanto del exón 7 como del promotor tienen un número de veces de diferencia numéricamente mayor para la producción de NO en respuesta a LA-419 5  $\mu\text{M}$ ,  $1,19 \pm 0,07$  ( $p = 0,02$ ) y  $1,17 \pm 0,08$  ( $p = 0,15$ ) respectivamente. Además, en la Tabla *gg1* se puede observar que las proporciones NO/ONOO<sup>-</sup> para los alelos mayoritarios del exón 7 y el promotor son numéricamente mayores en comparación con los demás genotipos, con valores de  $p$  respectivos de 0,06 y 0,07. No hubo ninguna diferencia significativa en el porcentaje de control para la generación de ONOO<sup>-</sup> en respuesta a LA-419 (5  $\mu\text{M}$ ) en los individuos de raza blanca para ninguno de los polimorfismos. Estas tendencias no se identificaron en la concentración de 1  $\mu\text{M}$  de LA-419 (Tablas *hh1 - hh3*).

También se examinó la comparación de los efectos de homocigotos de alelos mayoritarios con respecto a los portadores de alelos minoritarios en individuos de raza blanca, presentándose los datos en las Tablas *ii* y *jj*. En la comparación del exón 7, el homocigoto de alelos mayoritarios tuvo un número de veces de diferencia para la producción de NO en respuesta a LA-419 5  $\mu\text{M}$  en comparación a los portadores de alelos minoritarios de  $1,19 \pm 0,07$  frente a  $1,11 \pm 0,05$ , que fue significativamente diferente con un  $p = 0,01$  (Tabla *ii1*). No hubo ninguna diferencia significativa en el porcentaje de control para la generación de ONOO<sup>-</sup> en respuesta a LA-419 (5  $\mu\text{M}$ ) para el homocigoto de alelos mayoritarios en comparación con los portadores de alelos minoritarios en el exón 7. Por consiguiente, el homocigoto de alelos mayoritarios para el exón 7 tuvo un número de veces de diferencia para la proporción NO/ONOO<sup>-</sup> en respuesta a LA-419 5  $\mu\text{M}$  en comparación con los portadores de alelos minoritarios, de  $1,47 \pm 0,12$  frente a  $1,35 \pm 0,10$  ( $p = 0,027$ , Tabla *ii3*). Estuvieron presentes tendencias no significativas para las variantes de promotor, tanto para la producción de NO ( $p = 0,09$ , Tabla *ii1*) como para la proporción NO/ONOO<sup>-</sup> ( $p = 0,17$ , Tabla *ii3*). Estas tendencias no se observaron en la concentración de 1  $\mu\text{M}$  de LA-419, tablas *jj1 - jj3*.

5 Se examinó el efecto del genotipo en el % de control en individuos de raza blanca para las combinaciones alélicas completas de las variantes del exón 7 y de promotor, como se muestra en las Tablas *kk* y *ll*. Con la concentración de 5 µM de LA-419 se produjo un número de veces de diferencia numéricamente mayor para la producción de NO ( $p = 0,11$ , Tabla *kk1*) y la proporción NO/ONOO<sup>-</sup> ( $p = 0,0496$ , Tabla *kk3*) para la combinación de alelos dominantes, G/G + T/T. No estuvieron presentes tendencias similares para LA-419 1 µM (Tablas *ll1-ll3*).

10 Los datos de la variante de alelos mayoritarios (G/G + T/T) en comparación con la combinación de todas las demás variantes alélicas en individuos de raza blanca se dan en las Tablas *mm* y *nn*. La combinación alélica mayoritaria exhibió tendencias de un número de veces de diferencia mayor en la producción de NO ( $p = 0,068$ , Tabla *mm1*) y la proporción NO/ONOO<sup>-</sup> ( $p = 0,13$ , Tabla *mm3*) en respuesta a LA-419 5 µM. El genotipo de combinación G/G + T/T también tuvo una tendencia de un mayor número de veces de diferencia para la producción de NO en respuesta a LA-419 1 µM ( $p = 0,076$ , Tabla *nn1*) pero ninguna tendencia de una mayor proporción NO/ONOO<sup>-</sup> (Tabla *nn3*).

15 **Efecto del genotipo en el número de veces de diferencia en homocigotos de alelos minoritarios frente a homocigotos de alelos mayoritarios y heterocigotos**

20 Se examinó en todas las razas el efecto del genotipo en el número de veces de diferencia de NO, ONOO<sup>-</sup>, y NO/ONOO<sup>-</sup> en cada polimorfismo para los homocigotos de alelos minoritarios en comparación con la combinación de homocigotos de alelos mayoritarios y heterocigotos. Para el polimorfismo tanto de exón 7 como de promotor, el homocigoto de alelos minoritarios tuvo un número de veces de diferencia numéricamente inferior pero estadísticamente no significativo para la producción de NO y la proporción NO/ONOO<sup>-</sup> en respuesta a LA-419 5 µM (Tablas *oo1* y *oo3*). En la concentración de 1 µM de LA-419 esta tendencia estuvo presente para el polimorfismo de promotor, pero no fue clara en el polimorfismo de exón 7 (Tablas *pp1* y *pp3*).

25 Efectos del genotipo en el número de veces de diferencia para los homocigotos de alelos minoritarios T/T + C/C en comparación con la combinación de todas las demás variantes alélicas (Tablas *qq* y *rr*). No hubo ninguna tendencia clara en el número diferencial de veces de diferencia para NO, ONOO<sup>-</sup>, y NO/ONOO<sup>-</sup> en respuesta a cualquiera de las dosis de LA-419.

30 **Abundancia de proteínas eNOS**

Usando métodos inmunoquímicos, no hubo ningún cambio en ninguna afección con respecto a la abundancia de proteínas eNOS, Tablas *ss-L1*.

35 **Análisis del intrón 4**

No hubo ninguna respuesta relacionada con la dosis de alelos de genes para LA-419 (1 µM y 5 µM) para el polimorfismo del intrón 4, como se presenta en las Tablas *M1-M4* y *N1-N3* así como en las tablas del presente informe.

40 **APÉNDICE**

**Análisis de Actividad de eNOS**

**Efecto del Genotipo dentro del Grupo**

45 **Tablas a1-a3: Efecto de genotipos de eNOS dentro del grupo de control \***

**a1)**

NO (control)				
Variable	Nivel (n)	Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	343,87 (59,91)	0,4138	0,81
	G/T (18)	354,76 (77,61)		
	T/T (5)	348,07 (100,76)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	349,92 (51,75)	0,0975	0,95
	T/C (23)	349,55 (84,47)		
	C/C (4)	332,17 (80,88)		

<b>NO (control)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	353,53 (73,00)	3,1640	0,367
	b/a (10)	320,67 (65,74)		
	a/a (3)	386,33 (72,90)		
	c/c (1)	368,67 (0)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

\* El grupo de control es vehículo de LA-419.

a2)

<b>ONOO<sup>-</sup> (control)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	363,01 (84,61)	3,3296	0,19
	G/T (18)	3,65,94 (87,41)		
	T/T (5)	449,27 (111,48)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	362,95 (86,39)	0,6190	0,73
	T/C (23)	376,83 (91,28)		
	C/C (4)	404,92 (121,75)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	369,31 (86,00)	0,9010	0,825
	b/a (10)	368,03 (100,38)		
	a/a (3)	395,00 (128,17)		
	c/c (1)	426,33 (0)		

5 Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

a3)

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (control)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	1,02 (0,34)	0,6330	0,73
	G/T (18)	1,05 (0,37)		
	T/T (5)	0,85 (0,44)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	1,03 (0,33)	0,6682	0,72
	T/C (23)	1,01 (0,39)		
	C/C (4)	0,92 (0,46)		

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (control)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	1,03 (0,36)	0,2703	0,966
	b/a(10)	0,97 (0,41)		
	a/a (3)	1,07 (0,45)		
	c/c (1)	0,86 (0)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

**Tablas b1 - b3) Efecto de genotipos de eNOS dentro del grupo de LA-419 5 µM**

5 **b1)**

<b>NO (LA-419 5 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	398,92 (71,74)	0,3530	0,84
	G/T (18)	400,63 (80,27)		
	T/T (5)	390,47 (124,39)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	405,83 (58,51)	0,5336	0,77
	T/C(23)	396,81 (95,72)		
	C/C (4)	370,17 (86,78)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	400,83 (81,57)	2,5597	0,465
	b/a (10)	375,20 (81,45)		
	a/a (3)	438,33 (79,68)		
	c/c (1)	432,67 (0)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

**b2)**

<b>ONOO<sup>-</sup> (LA-419 5 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	288,82 (78,22)	2,5405	0,28
	G/T (18)	300,15 (75,86)		
	T/T (5)	366,40 (103,55)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	286,47 (76,65)	1,5269	0,47
	T/C (23)	310,97 (82,59)		
	C/C (4)	322,33 (110,70)		

<b>ONOO<sup>-</sup> (LA-419 5 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	298,99 (79,66)	1,4513	0,694
	b/a (10)	295,73 (85,11)		
	a/a (3)	331,22 (117,30)		
	c/c (1)	328,33 (0)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

b3)

<b>NO/ ONOO<sup>-</sup> (LA-419 5 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	1,50 (0,51)	1,3707	0,50
	G/T (18)	1,44 (0,49)		
	T/T (5)	1,21 (0,68)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	1,52 (0,45)	0,8254	0,66
	T/C (23)	1,41 (0,56)		
	C/C (4)	1,32 (0,71)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	1,46 (0,51)	0,3979	0,941
	b/a (10)	1,42 (0,61)		
	a/a (3)	1,48 (0,64)		
	c/c (1)	1,32 (0)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

5 **Tablas c1 - c3) Efecto de genotipos de eNOS dentro del grupo LA-419 1 µM**  
c1)

<b>NO (LA-419 1 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	367,13 (80,46)	4,6995	0,095
	G/T (18)	413,28 (58,46)		
	T/T (5)	368,80 (75,73)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	380,73 (75,61)	2,9185	0,23
	T/C (23)	396,32 (73,63)		
	C/C (4)	334,25 (68,06)		

<b>NO (LA-419 1 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	393,18 (77,21)	2,7011	0,440
	b/a (10)	377,23 (69,05)		
	a/a (3)	360,56 (80,60)		
	c/c (1)	270,00 (0)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

c2)

<b>ONOO<sup>-</sup> (LA-419 1 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	344,53 (83,88)	1,1225	0,57
	G/T (18)	319,43 (81,89)		
	T/T (5)	332,67 (129,30)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	335,82 (80,98)	3,5720	0,17
	T/C (23)	315,74 (78,13)		
	C/C (4)	430,17 (124,82)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	317,60 (74,77)	3,6974	0,296
	b/a (10)	330,47 (88,93)		
	a/a (3)	421,11 (124,25)		
	c/c (1)	423,67 (0)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

c3)

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (LA-419 1 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	1,16 (0,45)	1,8020	0,41
	G/T (18)	1,38 (0,38)		
	T/T (5)	1,29 (0,63)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	1,22 (0,43)	3,3685	0,19
	T/C (23)	1,35 (0,44)		
	C/C (4)	0,88 (0,50)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	1,33 (0,42)	2,8821	0,410
	b/a (10)	1,25 (0,46)		
	a/a (3)	0,97 (0,57)		
	c/c (1)	0,64 (0)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

**Tablas d1 - d3)** Efecto del genotipo dentro del grupo de control. Comparación entre homocigotos del alelo mayoritario y vehículos del alelo minoritario

**d1)**

<b>NO (control)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de t</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	343,87 (59,91)	0,5710	0,57
	G/T y T/T (23)	353,30 (80,67)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	349,92 (51,75)	0,0402	0,97
	T/C y C/C (27)	346,98 (82,66)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	353,53 (73,00)	-0,7110	0,481
	b/a, a/a, c/c (14)	338,17 (68,21)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

5

**d2)**

<b>ONOO<sup>-</sup> (control)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de t</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	363,01 (84,61)	0,8014	0,43
	G/T y T/T (23)	384,06 (96,95)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	362,95 (86,39)	-0,7035	0,49
	T/C y C/C (27)	380,99 (94,15)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	369,31 (86,00)	0,1103	0,913
	b/a, a/a, c/c (14)	377,98 (99,12)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

**d3)**

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (control)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de t</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	1,02 (0,34)	-0,2104	0,83
	G/T y T/T (23)	1,01 (0,39)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	1,03 (0,33)	0,3518	0,73
	T/C y C/C (27)	1,00 (0,39)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	1,03 (0,36)	-0,0123	0,990
	b/a, a/a, c/c (14)	0,99 (0,39)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

10

## ES 2 587 191 T3

**Tablas e1 - e3** Efecto del genotipo dentro del grupo de LA-419 (5 µM). Comparación entre homocigotos del alelo mayoritario y vehículos del alelo minoritario

**e1)**

<b>NO (LA-419 5 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de t</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	398,92 (71,74)	-0,0100	0,99
	G/T y T/T (23)	398,42 (88,37)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	405,83 (58,51)	0,1709	0,85
	T/C y C/C (27)	392,86 (93,35)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	400,83 (81,57)	-0,1103	0,913
	b/a, a/a, c/c (14)	392,83 (80,05)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

5

**e2)**

<b>ONOO<sup>-</sup> (LA-419 5 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de t</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	288,82 (78,22)	1,1219	0,27
	G/T y T/T (23)	314,55 (84,72)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	286,47 (76,65)	-1,2161	0,23
	T/C y C/C (27)	312,65 (84,87)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	298,99 (79,66) ,	0,2329	0,817
	b/a, a/a, c/c (14)	305,67 (86,01)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

**e3)**

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (LA-419 5 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de t</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	1,50 (0,51)	-0,9917	0,33
	G/T y T/T (23)	1,39 (0,53)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	1,52 (0,45)	0,8744	0,39
	T/C y C/C (27)	1,39 (0,57)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	1,46 (0,51)	0,1103	0,913
	b/a, a/a, c/c (14)	1,43 (0,57)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

**Tablas f1 - f3) Efecto del genotipo dentro del grupo de LA-419 (1  $\mu$ M). Comparación entre homocigotos del alelo mayoritario y vehículos del alelo minoritario**

**f1)**

<b>NO (LA-419 1 <math>\mu</math>M)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media <math>\pm</math> dt)</b>	<b>Estadística de t</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	367,13 (80,46)	1,7730	0,08
	G/T y T/T (23)	403,61 (63,52)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	380,73 (75,61)	-0,6332	0,53
	T/C y C/C (27)	387,12 (75,01)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	393,18 (77,21)	-1,0420	0,303
	b/a, a/a, c/c (14)	366,00 (71,50)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

5 **f2)**

<b>ONOO<sup>-</sup> (LA-419 1 <math>\mu</math>M)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media <math>\pm</math> dt)</b>	<b>Estadística de t</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	344,53 (83,88)	-1,0118	0,32
	G/T y T/T (23)	322,30 (90,85)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	335,82 (80,98)	0,3719	0,71
	T/C y C/C (27)	332,69 (93,16)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	317,60 (74,77)	1,1402	0,260
	b/a, a/a, c/c (14)	356,55 (98,40)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

**f3)**

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (LA-419 1 <math>\mu</math>M)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media <math>\pm</math> dt)</b>	<b>Estadística de t</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	1,16 (0,45)	1,3322	0,19
	G/T y T/T (23)	1,36 (0,43)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	1,22 (0,43)	-0,4121	0,68
	T/C y C/C (27)	1,28 (0,47)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	1,33 (0,42)	-0,9439	0,350
	b/a, a/a, c/c (14)	1,15 (0,48)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

**Tablas g1 - g3** Efecto de combinaciones de genotipo dentro del grupo de control (Combinación alélica individual).  
Grupo de referencia = G/G + T/T

**g1)**

<b>NO (control)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	G/G + T/T (18)	343,07 (49,58)	3,0055	0,81
	G/G + T/C (8)	345,67 (82,72)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (4)	380,75 (57,17)		
	G/T + T/C (13)	344,18 (85,29)		
	G/T + C/C (1)	388,33 (0)		
	T/T + T/C (2)	400,00 (127,28)		
	T/T + C/C (3)	313,44 (87,80)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

5

**g2)**

<b>ONOO<sup>-</sup> (control)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	G/G + T/T (18)	371,52 (91,89)	5,5092	0,48
	G/G + T/C (8)	343,88 (66,73)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (4)	324,42 (44,40)		
	G/T + T/C (13)	383,92 (95,01)		
	G/T + C/C (1)'	298,33 (0)		
	T/T + T/C (2)	462,50 (140,71)		
	T/T + C/C (3)	440,44 (121,09)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

**g3)**

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (control)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	G/G + T/T (18)	1,00 (0,34)	2,4033	0,88
	G/G + T/C (8)	1,07 (0,37)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (4)	1,19 (0,25)		
	G/T + T/C (13)	0,98 (0,40)		
	G/T + C/C (1)	1,3016760 (0)		

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (control)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	T/T + T/C (2)	0,95 (0,56)		
	T/T + C/C (3)	0,79 (0,46)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

**Tablas h1 - h3** Efecto de combinaciones de genotipo dentro del grupo de LA-419 5 µM (Combinación alélica individual). Grupo de referencia = G/G + T/T

**h1)**

<b>NO (LA-419 5 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	G/G + T/T (18)	399,67 (56,96)	2,7891	0,83
	G/G + T/C (8)	397,25 (102,46)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (4)	433,58 (65,75)		
	G/T + T/C (13)	387,90 (86,10)		
	G/T + C/C (1)	434,33 (0)		
	T/T + T/C (2)	453,00 (178,19)		
	T/T + C/C (3)	348,78 (92,48)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

5

**h2)**

<b>ONOO<sup>-</sup> (LA-419 5 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	G/G + T/T (18)	293,93 (83,07)	5,1552	0,5241
	G/G + T/C (8)	277,33 (69,85)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (4)	252,92 (13,69)		
	G/T + T/C (13)	318,33 (82,55)		
	G/T + C/C (1)	252,67 (0)		
	T/T + T/C (2)	397,67 (96,64)		
	T/T + C/C (3)	345,56 (123,07)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

h3)

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (LA-419 5 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	G/G + T/T (18)	1,48 (0,48)	3,1462	0,79
	G/G + T/C (8)	1,56 (0,60)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (4)	1,71 (0,21)		
	G/T + T/C (13)	1,34 (0,54)		
	G/T + C/C (1)	1,72 (0)		
	T/T + T/C (2)	1,23 (0,75)		
	T/T + C/C (3)	1,19 (0,80)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

**Tablas i1 - i3)** Efecto de combinaciones de genotipo dentro del grupo de LA-419 1 µM (Combinación alélica individual).  
Grupo de referencia = G/G + T/T

5 i1)

<b>NO (LA-419 1 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	G/G + T/T (18)	374,30 (78,06)	7,3555	0,29
	G/G + T/C (8)	351,00 (88,83)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (4)	409,67 (64,25)		
	G/T + T/C (13)	420,44 (56,87)		
	G/T + C/C (1)	334,67 (0)		
	T/T + T/C (2)	420,83 (4,48)		
	T/T + C/C (3)	334,11 (83,36)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

i2)

<b>ONOO<sup>-</sup> (LA-419 1 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	G/G + T/T (18)	338,98 (81,16)	9,3929	0,15
	G/G + T/C (8)	357,00 (94,18)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (4)	321,58 (90,82)		
	G/T + T/C (13)	302,82 (59,66)		
	G/T + C/C (1)	526,67 (0)		
	T/T + T/C (2)	234,67 (23,10)		
	T/T + C/C (3)	398,00 (131,00)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

i3)

NO/ONOO <sup>-</sup> (LA-419 1 µM)				
Variable	Nivel (n)	Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	G/G + T/T (18)	1,19,(0,43)	9,1043	0,17
	G/G + T/C (8)	1,09 (0,51)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (4)	1,37 (0,44)		
	G/T + T/C (13)	1,44 (0,32)		
	G/T + C/C (1)	0,64 (0)		
	T/T + T/C (2)	1,80 (0,16)		
	T/T + C/C (3)	0,96 (0,58)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

**Tablas j1-j3)** Efecto de combinaciones de genotipo dentro del grupo de control (combinación de referencia frente a todos los vehículos).

5

Grupo de referencia = G/G + T/T.

Combinación = G/G + T/C, G/G/ + C/C, G/T + T/T, G/T + T/C, G/T + C/C, T/T + T/C, T/T + C/C

j1)

NO (control)				
Variable	Nivel (n)	Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (18)	343,07 (49,58)	-0,5911	0,556
	Combinación (31)	351,33 (79,88)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

10

j2)

ONOO <sup>-</sup> (control)				
Variable	Nivel (n)	Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (18)	371,52 (91,89)	-0,2489	0,80
	Combinación (31)	373,69 (90,83)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

j3)

NO/ONOO <sup>-</sup> (control)				
Variable	Nivel (n)	Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (18)	1,00 (0,34)	-0,0933	0,93
	Combinación (31)	1,02 (0,38)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

15 **Tablas k1 - k3)** Efecto de combinaciones de genotipo dentro del grupo de LA-419 5 µM (combinación de referencia frente a todos los vehículos).

Grupo de referencia = G/G + T/T,

Combinación = G/G + T/C, G/G/ + C/C, G/T + T/T, G/T + T/C, G/T + C/C, T/T + T/C, T/T + C/C

k1)

<b>NO (LA-419 5 µM)</b>				
Variable	Nivel (n)	Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (18)	399,67 (56,96)	-0,3629	0,72
	Combinación (31)	398,12 (90,43)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

k2)

<b>ONOO<sup>-</sup> (LA-419 5 µM)</b>				
Variable	Nivel (n)	Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (18)	293,93 (83,07)	-0,7259	0,47
	Combinación (31)	304,95 (81,70)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

5

k3)

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (LA-419 5 µM)</b>				
Variable	Nivel (n)	Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (18)	1,48 (0,48)	0,3837	0,70
	Combinación (31)	1,43 (0,54)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

**Tablas I1 - I3** Efecto de combinaciones de genotipo dentro del grupo de LA-419 1 µM (combinación de referencia frente a todos los vehículos).

10

Grupo de referencia = G/G + T/T,  
Combinación = G/G + T/C, G/G/ + C/C, G/T + T/T, G/T + T/C, G/T + C/C, T/T + T/C, T/T + C/C

I1)

<b>NO (LA-419 1 µM)</b>				
Variable	Nivel (n)	Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (18)	374,30 (78,06)	-1,1096	0,27
	Combinación (31)	390,03 (73,13)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

I2)

<b>ONOO<sup>-</sup> (LA-419 1 µM)</b>				
Variable	Nivel (n)	Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (18)	338,98 (81,16)	0,4667	0,64
	Combinación (31)	331,26 (91,43)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

15

13)

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (LA-419 1 µM)</b>				
Variable	Nivel (n)	Liberación máxima, nmoles/l (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (18)	1,19 (0,43)	-0,7155	0,48
	Combinación (31)	1,29 (0,46)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

**Aumento Neto con Respecto al Control**

Tablas m1 - m3) Aumento neto en LA-419 5 µM con respecto al control – comparación entre genotipos m1)'

5

<b>NO (LA-419 5 µM)</b>				
Variable	Nivel (n)	Aumento neto, nmoles/l (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	55,05 (21,03)	2,9488	0,23
	G/T (18)	45,87 (19,24)		
	T/T(5)	42,40 (30,77)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	55,91 (19,06)	3,1740	0,20
	T/C(23)	47,26 (23,70)		
	C/C (4)	38,00 (17,39)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	47,30 (22,42)	1,2423	0,743
	b/a (10)	54,53 (23,50)		
	a/a (3)	52,00 (16,74)		
	c/c (1)	64,00 (0)		

Aumento neto = promedio de 5 µM - promedio de Control. Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

m2)

<b>ONOO<sup>-</sup> (LA-419 5 µM)</b>				
Variable	Nivel (n)	Aumento neto, nmoles/l (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	-74,19 (29,80)	1,7603	0,41
	G/T(18)	-65,80 (26,77)		
	T/T (5)	-82,87 (28,56)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	-76,48 (33,23)	1,7456	0,42
	T/C (23)	-65,86 (23,41)		
	C/C (4)	-82,58 (26,16)		

<b>ONOO<sup>-</sup> (LA-419 5 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Aumento neto, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	-70,32 (30,56)	1,4292	0,699
	b/a (10)	-72,30 (25,81)		
	a/a(3)	-63,78 (14,11)		
	c/c (1)	-98,00 (0)		

Aumento neto = promedio de 5 µM - promedio de Control. Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

m3)

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (LA-419 5 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Aumento neto, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	-0,85 (0,52)	2,3998	0,30
	G/T(18)	-0,94 (0,88)		
	T/T (5)	-0,78 (1,05)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	-0,95 (0,67)	2,0061	0,37
	T/C (23)	-0,86 (0,80)		
	C/C (4)	-0,52 (0,36)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	0,43 (0,20)	0,0468	0,997
	b/a (10)	0,45 (0,22)		
	a/a (3)	0,41 (0,19)		
	c/c (1)	0,46 (0)		

Aumento neto = promedio de 5 µM - promedio de Control. Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

**Tablas n1 - n3) Aumento neto en LA-419 1 µM con respecto al control – comparación entre genotipos n1)**

5

<b>NO (LA-419 1 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Aumento neto, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	23,26 (70,68)	1,1059	0,58
	G/T (18)	58,52 (72,43)		
	T/T (5)	20,73 (66,94)		

<b>NO (LA-419 1 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Aumento neto, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	30,80 (64,85)	2,6735	0,26
	T/C (23)	46,77 (81,32)		
	C/C (4)	2,08 (39,61)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	39,66 (70,27)	3,6920	0,297
	b/a (10)	56,57 (67,97)		
	a/a (3)	-25,78 (104,49)		
	c/c (1)	-98,67 (0)		

Aumento neto = promedio de 1 µM - promedio de Control. Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

n2)

<b>ONOO<sup>-</sup> (LA-419 1 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Aumento neto, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	-18,49 (93,20)	3,2587	0,20
	G/T (18)	-46,52 (105,03)		
	T/T (5)	-116,60(117,55)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	-27,14 (82,12)	2,5212	0,28
	T/C (23)	-61,09 (111,68)		
	C/C (4)	25,25 (135,63)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	-51,71 (108,03)	2,0897	0,554
	b/a (10)	-37,57 (99,15)		
	a/a (3)	26,11 (116,99)		
	c/c (1)	-2,67 (0)		

Aumento neto = promedio de 1 µM - promedio de Control. Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

n3)

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (LA-419 1 µM)</b>				
Variable	Nivel (n)	Aumento neto, nmoles/l (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	0,53 (7,59)	3,9613	0,14
	G/T (18)	-1,12 (1,02)		
	T/T (5)	-0,31 (0,61)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	0,77 (8,26)	2,2432	0,33
	T/C (23)	-0,99 (0,94)		
	C/C(4)	-0,48 (0,48)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	0,29 (0,47)	3,0652	0,382
	b/a (10)	0,28 (0,43)		
	a/a (3)	-0,11 (0,56)		
	c/c (1)	-0,23 (0)		

Aumento neto = promedio de 1 µM - promedio de Control. Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

**Tablas o1 - o3)** Aumento neto en LA-419 5 µM con respecto al control - comparación entre homocigotos del alelo mayoritario y vehículos del alelo minoritario

5

o1)

<b>NO (LA-419 5 µM)</b>				
Variable	Nivel (n)	Aumento neto, nmoles/l (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	55,05 (21,03)	-1,6829	0,10
	G/T y T/T (23)	45,12 (21,46)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	55,91 (19,06)	1,5780	0,12
	T/C y C/C (27)	45,89 (22,83)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	47,30 (22,42)	0,7723	0,444
	b/a, a/a, c/c (14)	47,30 (22,42)		

Aumento neto = promedio de 5 µM - promedio de Control. Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

o2)

<b>ONOO<sup>-</sup> (LA-419 5 µM)</b>				
Variable	Nivel (n)	Aumento neto, nmoles/l (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	-74,19 (29,80)	0,4107	0,68
	G/T y T/T (23)	-69,51 (27,46)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	-76,48 (33,23)	-0,7839	0,44
	T/C y C/C (27)	-68,33 (24,07)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	-70,32 (30,56)	-0,4904	0,626
	b/a, a/a, c/c (14)	-72,31 (23,65)		

Aumento neto = promedio de 5 µM - promedio de Control. Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

o3)

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (LA-419 5 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Aumento neto, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de t</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	-0,85 (0,52)	1,0117	0,32
	G/T y T/T (23)	-0,91 (0,90)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	-0,95 (0,67)	-1,0754	0,29
	T/C y C/C (27)	-0,81 (0,76)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	0,43 (0,20)	0,1594	0,874
	b/a, a/a, c/c (14)	0,44 (0,20)		

Aumento neto = promedio de 5 µM - promedio de Control. Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

**Tablas p1 - p3** Aumento neto en LA-419 1 µM con respecto al control - comparación entre homocigotos del alelo mayoritario y vehículos del alelo minoritario

5

p1)

<b>NO (LA-419 1 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Aumento neto, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de t</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	23,26 (70,64)	0,2204	0,83
	G/T y T/T (23)	50,30 (71,57)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	30,80 (64,85)	0,1307	0,90
	T/C y C/C (27)	40,15 (77,70)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	39,66 (70,27)	-0,1103	0,913
	b/a, a/a, c/c (14)	27,83 (86,07)		

Aumento neto = promedio de 1 µM - promedio de Control. Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

p2)

<b>ONOO<sup>-</sup> (LA-419 1 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Aumento neto, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de t</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	-18,49 (93,20)	-1,2321	0,22
	G/T y T/T (23)	-61,75 (109,14)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	-27,14 (82,12)	1,2664	0,21
	T/C y C/C (27)	-48,30 (116,85)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	-51,71 (108,03)	0,6620	0,511
	b/a, a/a, c/c (14)	-21,43 (98,29)		

Aumento neto = promedio de 1 µM - promedio de Control. Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

p3)

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (LA-419 1 μM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Aumento neto, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de t</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	0,53 (7,59)	0,3105	0,76
	G/T y T/T (23)	-0,93 (0,99)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	0,77 (8,26)	-0,3518	0,73
	T/C y C/C (27)	-0,91 (0,90)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	0,29 (0,47)	-0,6252	0,535
	b/a, a/a, c/c (14)	0,16 (0,46)		

Aumento neto = promedio de 1 μM - promedio de Control. Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

**Tablas q1 - q3)** Aumento neto en LA-419 5 μM con respecto al control (Combinación alélica individual).

Grupo de referencia = G/G + T/T

5

q1)

<b>NO (aumento de LA-419 5 μM con respecto al Control)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Aumento neto, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	G/G + T/T (18)	56,59 (19,21)	4,2869	0,64
	G/G + T/C (8)	51,58 (25,77)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (4)	52,83 (20,89)		
	G/T + T/C (13)	43,72 (19,86)		
	G/T + C/C (1)	46,00 (0)		
	T/T + T/C (2)	53,00 (50,91)		
	T/T + C/C (3)	35,33 (20,27)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

q2)

<b>ONOO<sup>-</sup> (aumento de LA-419 5 μM con respecto al Control)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Aumento neto, nmoles/l (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	G/G + T/T (18)	-77,59 (31,16)	5,1514	0,52
	G/G + T/C (8)	-66,54 (26,77)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (4)	-71,50 (46,74)		
	G/T + T/C (13)	-65,59 (20,60)		
	G/T + C/C (1)	-45,67 (0)		
	T/T + T/C (2)	-64,83 (44,08)		
	T/T + C/C (3)	-94,89 (10,87)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

q3)

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (aumento de LA-419 5 µM con respecto al Control)</b>				
Variable	Nivel (n)	Aumento neto, nmoles/l (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	G/G + T/T (18)	-0,88 (0,54)	4,8102	0,57
	G/G + T/C (8)	-0,78 (0,51)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (4)	-1,29 (1,15)		
	G/T + T/C (13)	-0,83 (0,84)		
	G/T + C/C (1)	-1,01 (0)		
	T/T + T/C (2)	-1,41 (1,74)		
	T/T + C/C (3)	-0,36 (0,18)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

**Tablas r1 - r3)** Aumento neto en LA-419 1 µM con respecto al control (Combinación alélica individual).

Grupo de referencia = G/G + T/T

r1)

<b>NO (aumento de LA-419 1 µM con respecto al Control)</b>				
Variable	Nivel (n)	Aumento neto, nmoles/l (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	G/G + T/T (18)	31,22 (71,86)	5,6060	0,47
	G/G + T/C (8)	5,33 (68,90)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (4)	28,92 (13,00)		
	G/T + T/C (13)	76,26 (75,55)		
	G/T + C/C (1)	-53,67 (0)		
	T/T + T/C (2)	20,83 (131,76)		
	T/T + C/C (3)	20,67 (16,77)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

5

r2)

<b>ONOO<sup>-</sup> (aumento de LA-419 1 µM con respecto al Control)</b>				
Variable	Nivel (n)	Aumento neto, nmoles/l (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	G/G + T/T (18)	-32,54 (86,18)	10,6444	0,10
	G/G + T/C (8)	13,13 (106,46)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (4)	-2,83 (64,48)		
	G/T + T/C (13)	-81,10 (79,76)		
	G/T + C/C (1)	228,33 (0)		
	T/T + T/C (2)	-227,83 (117,62)		
	T/T + C/C (3)	-42,44 (9,91)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

r3)

NO/ONOO <sup>-</sup> (aumento de LA-419 1 µM con respecto al Control)				
Variable	Nivel (n)	Aumento neto, nmoles/l (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	G/G + T/T (18)	1,16 (9,12)	6,7479	0,34
	G/G + T/C (8)	-0,88 (0,63)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (4)	-0,99 (1,06)		
	G/T + T/C (13)	-1,21 (1,06)		
	G/T + C/C (1)	-0,24 (0)		
	T/T + T/C (2)	0,07 (0,61)		
	T/T + C/C (3)	-0,56 (0,56)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

**Tablas s1 - s3** Aumento neto en LA-419 5 µM con respecto al control. Comparación entre homocigoto del alelo mayoritario y vehículos del alelo minoritario (combinación de referencia frente a todos los vehículos).

- 5 Grupo de referencia = G/G + T/T.  
Combinación = G/G + T/C, G/G/ + C/C, G/T + T/T, G/T + T/C, G/T + C/C, T/T + T/C, T/T + C/C

s1)

NO (aumento de LA-419 5 µM con respecto al Control)				
Variable	Nivel (n)	Aumento neto, nmoles/l (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (18)	56,59 (19,21)	1,55	0,13
	Combinación (31)	46,78 (22,38)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

10

s2)

ONOO <sup>-</sup> ((aumento de LA-419 5 µM con respecto al Control)				
Variable	Nivel (n)	Aumento neto, nmoles/l (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (18)	-77,59 (31,16)	-0,8088	0,42
	Combinación (31)	-68,74 (26,87)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

s3)

NO/ONOO <sup>-</sup> (aumento de LA-419 5 µM con respecto al Control)				
Variable	Nivel (n)	Aumento neto, nmoles/l (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (18)	-0,88 (0,54)	-0,9436	0,35
	Combinación (31)	-0,87 (0,81)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

**Tablas t1 - t3** Aumento neto en LA-419 1 µM con respecto al control. Comparación entre homocigoto del alelo mayoritario y vehículos del alelo minoritario (combinación de referencia frente a todos los vehículos).

Grupo de referencia = G/G + T/T.

5 Combinación = G/G + T/C, G/G/ + C/C, G/T + T/T, G/T + T/C, G/T + C/C, T/T + T/C, T/T + C/C

t1)

NO (aumento de LA-419 1 µM con respecto al Control)				
Variable	Nivel (n)	Aumento neto, nmoles/l (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (18)	31,22 (71,86)	0,3837	0,70
	Combinación (31)	38,70 (72,56)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

t2)

ONOO <sup>-</sup> ((aumento de LA-419 1 µM con respecto al Control)				
Variable	Nivel (n)	Aumento neto, nmoles/l (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (18)	-32,54 (86,18)	0,7052	0,48
	Combinación (31)	-42,43 (111,75)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

10

t3)

NO/ONOO <sup>-</sup> (aumento de LA-419 1 µM con respecto al Control)				
Variable	Nivel (n)	Aumento neto, nmoles/l (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (18)	1,16 (9,12)	-0,3422	0,73
	Combinación (31)	-0,92 (0,90)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

**Porcentaje de Cambio**

**Tablas u1 - u3** % de Cambio – Respuesta media para todos los genotipos y razas (LA-419 5 µM)

15 % de Cambio = (promedio de 5 µM - promedio de control)/(promedio de control) \*100

u1)

NO (LA-419 5 µM)				
Variable	Nivel (n)	% de Cambio (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	15,93 (6,37)	4,1721	0,12
	G/T (18)	13,43 (6,31)		
	T/T(5)	11,67 (6,86)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	16,16 (5,97)	3,0028	0,22
	T/C (23)	13,58 (6,82)		
	C/C (4)	11,63 (5,99)		

<b>NO (LA-419 5 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>% de Cambio (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	13,52 (6,80)	2,1674	0,538
	b/a (10)	16,81 (6,88)		
	a/a (3)	13,60 (3,88)		
	c/c (1)	17,36 (0)		
<b>Raza</b>				
	Asiática (1)	13,97 (0)	3,2768	0,66
	Negra (12)	12,82 (5,82)		
	Blanca (26)	14,30 (6,78)		
	Blanca/Negra (2)	16,93 (4,34)		
	Hispana (6)	17,23 (7,65)		
	No Informada (2)	18,69 (5,53)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

% de Cambio - Respuesta media para todos los genotipos y razas (LA-419 5 µM)

$$\% \text{ de Cambio} = (\text{promedio de } 5 \mu\text{M} - \text{promedio de control}) / (\text{promedio de control}) * 100$$

5

u2)

<b>ONOO<sup>-</sup> (LA-419 5 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>% de Cambio (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	-20,65 (7,38)	1,9795	0,37
	G/T (18)	-17,85 (6,26)		
	T/T (5)	-19,03 (8,40)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	-20,98 (8,19)	0,9125	0,63
	T/C (23)	-17,73 (5,53)		
	C/C (4)	-21,03 (7,77)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	-19,19 (7,76)	1,5576	0,669
	b/a (10)	-19,70 (5,79)		
	a/a (3)	-16,60 (3,31)		
	c/c (1)	-22,99 (0)		

<b>ONOO<sup>-</sup> (LA-419 5 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>% de Cambio (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Raza</b>				
	Asiática (1)	-27,79 (0)	14,2033	0,01†
	Negra (12)	-16,43 (6,22)		
	Blanca (26)	-17,84 (5,90)		
	Blanca/Negra (2)	-25,30 (9,90)		
	Hispana (6)	-25,17 (5,79)		
	No Informada (2)	-31,56 (5,34)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

% de Cambio - Respuesta media para todos los genotipos y razas (LA-419 5 µM)

$$\% \text{ de Cambio} = (\text{promedio de } 5 \mu\text{M} - \text{promedio de control}) / (\text{promedio de control}) * 100$$

5

u3)

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (LA-419 5 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>% de Cambio (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	47,91 (17,67)	4,4466	0,11
	G/T (18)	38,86 (13,20)		
	T/T (5)	39,03 (13,43)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	49,09 (17,76)	2,9791	0,23
	T/C (23)	38,74 (13,67)		
	C/C (4)	42,33 (13,21)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	42,24 (17,73)	0,9604	0,811
	b/a (10)	45,81 (14,36)		
	a/a (3)	36,75 (3,58)		
	c/c (1)	52,87 (0)		
<b>Raza</b>				
	Asiática (1)	57,83 (0)	16,6884	0,01†
	Negra (12)	36,30 (14,59)		
	Blanca (26)	39,65 (12,24)		
	Blanca/Negra (2)	58,92 (16,01)		
	Hispana (6)	57,79 (12,24)		
	No Informada (2)	75,55 (20,43)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

ES 2 587 191 T3

Tablas v1 - v3) % de Cambio - Respuesta media para todos los genotipos y razas (LA-419 1 µM)  
 % de Cambio = (promedio de 1 µM - promedio de control)/(promedio de control) \*100

v1)

NO (LA-419 1 µM)				
Variable	Nivel (n)	% de Cambio (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	7,77 (18,82)	0,5639	0,75
	G/T (18)	20,99 (29,98)		
	T/T (5)	8,69 (18,85)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	9,48 (17,79)	2,0563	0,36
	T/C (23)	17,70 (29,53)		
	C/C (4)	1,91 (11,63)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	13,46 (23,13)	4,2767	0,233
	b/a (10)	20,51 (28,08)		
	a/a (3)	-4,57 (24,67)		
	c/c (1)	-26,76 (0)		
<b>Raza</b>				
	Asiática (1)	8,95 (0)	9,1530	0,10
	Negra (12)	-4,73 (18,81)		
	Blanca (26)	21,25 (25,58)		
	Blanca/Negra (2)	9,57 (6,43)		
	Hispana (6)	11,74 (17,99)		
	No Informada (2)	14,50 (2,19)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

5

% de Cambio - Respuesta media para todos los genotipos y razas (LA-419 1 µM)  
 % de Cambio = (promedio de 1 µM - promedio de control)/(promedio de control) \*100

v2)

ONOO <sup>-</sup> (LA-419 1 µM)				
Variable	Nivel (n)	% de Cambio (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	-2,10 (27,33)	2,8861	0,24
	G/T (18)	-9,58 (26,95)		
	T/T (5)	-25,44 (21,34)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	-5,17 (21,75)	3,9697	0,14
	T/C (23)	-12,40 (28,22)		
	C/C (4)	11,13 (43,85)		

ONOO <sup>-</sup> (LA-419 1 µM)				
Variable	Nivel (n)	% de Cambio (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	-10,24 (27,17)	2,5320	0,470
	b/a (10)	-6,58 (30,92)		
	a/a (3)	9,62 (33,98)		
	c/c (1)	-0,63 (0)		
<b>Raza</b>				
	Asiática (1)	-18,50 (0)	15,2522	0,01†
	Negra (12)	16,25 (36,48)		
	Blanca (26)	-18,41 (17,30)		
	Blanca/Negra (2)	9,37 (21,79)		
	Hispana (6)	-6,29 (19,74)		
	No Informada (2)	-16,55 (2,66)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

% de Cambio - Respuesta media para todos los genotipos y razas (LA-419 1 µM)

$$\% \text{ de Cambio} = (\text{promedio de } 1 \mu\text{M} - \text{promedio de control}) / (\text{promedio de control}) * 100$$

v3)

NO/ONOO <sup>-</sup> (LA-419 1 µM)				
Variable	Nivel (n)	% de Cambio (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	21,83 (51,78)	0,7130	0,70
	G/T (18)	50,45 (77,28)		
	T/T(5)	61,97 (81,82)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	25,48 (51,97)	2,6416	0,27
	T/C (23)	52,82 (77,96)		
	C/C (4)	2,52 (35,64)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	43,27 (71,09)	3,4675	0,325
	b/a (10)	42,92 (65,15)		
	a/a (3)	-3,62 (44,56)		
	c/c (1)	-26,15 (0)		
<b>Raza</b>				
	Asiática (1)	33,68 (0)	15,0458	0,01†
	Negra (12)	-8,17 (36,37)		
	Blanca (26)	61,80 (74,46)		
	Blanca/Negra (2)	3,77 (26,27)		
	Hispana (6)	26,85 (45,85)		
	No Informada (2)	37,24 (1,75)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

**Tabla x1)** Proporción de % de Cambio de NO / % de Cambio de ONOO<sup>-</sup> (LA-419 5 µM):

<b>% de Cambio de NO / % de Cambio de ONOO<sup>-</sup> (LA-419 5 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>% de Proporción de Cambio (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	-0,82 (0,40)	0,5943	0,74
	G/T (18)	-0,88 (0,60)		
	T/T (5)	-0,80 (0,73)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	-0,90 (0,47)	1,2795	0,53
	T/C (23)	-0,81 (0,56)		
	C/C (4)	-0,62 (0,39)		
<b>Raza</b>				
	Asiática (1)	-0,50 (0)	1,9471	0,86
	Negra (12)	-0,79 (0,44)		
	Blanca (26)	-0,92 (0,59)		
	Blanca/Negra (2)	-0,76 (0,47)		
	Hispana (6)	-0,73 (0,40)		
	No Informada (2)	-0,59 (0,08)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

**Tabla x2)** Proporción de % de Cambio de NO / % de Cambio de ONOO<sup>-</sup> (LA-419 1 µM):

<b>% de Cambio de NO / % de Cambio de ONOO<sup>-</sup> (LA-419 1 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>% de Proporción de Cambio (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	0,76 (8,64)	1,8736	0,39
	G/T (18)	-1,15,(0,91)		
	T/T (5)	-0,66 (1,02)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	1,06 (9,40)	0,9272	0,63
	T/C (23)	-1,06 (0,82)		
	C/C (4)	-0,80 (1,04)		
<b>Raza</b>				
	Asiática (1)	-0,48 (0)	2,2419	0,81
	Negra (12)	2,81 (12,60)		
	Blanca (26)	-1,09 (1,30)		
	Blanca/Negra (2)	-1,07 (1,80)		
	Hispana (6)	-0,90 (0,55)		
	No Informada (2)	-0,90 (0,28)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

##### 5 **Número de Veces de Diferencia**

**Tablas y1 - y3)** Número de veces de diferencia de LA-419 5 µM – comparación entre genotipos

$$\text{Número de veces de diferencia} = (\text{LA-419 5 } \mu\text{M})/(\text{control})$$

y1)

<b>NO (LA-419 5 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Número de veces de diferencia (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	1,16 (0,06)	4,1721	0,12
	G/T (18)	1,13 (0,06)		
	T/T (5)	1,12 (0,07)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	1,16 (0,06)	3,0028	0,22
	T/C (23)	1,14 (0,07)		
	C/C (4)	1,12 (0,06)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	1,14(0,07)	2,1674	0,538
	b/a (10)	1,17 (0,07)		
	a/a (3)	1,14 (0,04)		
	c/c (1)	1,17 (0)		

Número de veces de diferencia = promedio de 5 µM / promedio de Control. Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

5

y2)

<b>ONOO<sup>-</sup> (LA-419 5 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Número de veces de diferencia (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	0,79 (0,07)	1,9795	0,37
	G/T (18)	0,82 (0,06)		
	T/T (5)	0,81 (0,08)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	0,79 (0,08)	0,9125	0,63
	T/C (23)	0,82 (0,06)		
	C/C (4)	0,79 (0,08)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	0,81 (0,08)	1,5576	0,669
	b/a (10)	0,80 (0,06)		
	a/a (3)	0,83 (0,03)		
	c/c (1)	0,77 (0)		

Número de veces de diferencia = promedio de 5 µM / promedio de Control. Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

y3)

NO/ONOO <sup>-</sup> (LA-419 5 µM)				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	1,48 (0,18)	4,4466	0,108
	G/T (18)	1,39 (0,13)		
	T/T (5)	1,39 (0,13)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	1,49 (0,18)	2,9791	0,226
	T/C (23)	1,39 (0,14)		
	C/C (4)	1,42 (0,13)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	1,42 (0,18)	0,9604	0,811
	b/a (10)	1,46 (0,14)		
	a/a (3)	1,37 (0,04)		
	c/c (1)	1,53 (0)		

Número de veces de diferencia = promedio de 5 µM / promedio de Control. Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

- 5 **Tablas z1 - z3) Número de veces de diferencia de LA-419 1 µM) – comparación entre genotipos**  
**Número de veces de diferencia = (LA-419 1 µM)/(control)**

z1)

NO (LA-419 1 µM)				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	1,08 (0,19)	0,5639	0,75
	G/T (18)	1,21 (0,30)		
	T/T (5)	1,09 (0,19)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	1,09 (0,18)	2,0563	0,36
	T/C (23)	1,18 (0,30)		
	C/C (4)	1,02 (0,12)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	1,13 (0,23)	4,276	0,233
	b/a (10)	1,21 (0,28)		
	a/a (3)	0,95 (0,25)		
	c/c (1)	0,73 (0)		

Número de veces de diferencia = promedio de 1 µM / promedio de Control. Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

z2)

ONOO <sup>-</sup> (LA-419 1 µM)				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	0,98 (0,27)	2,8861	0,24
	G/T (18)	0,90 (0,27)		
	T/T (5)	0,75 (0,21)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	0,95 (0,22)	3,9697	0,14
	T/C (23)	0,88 (0,28)		
	C/C (4)	1,11 (0,44)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	0,90 (0,27)	2,5320	0,470
	b/a (10)	0,93 (0,31)		
	a/a (3)	1,10 (0,34)		
	c/c (1)	0,99 (0)		

Número de veces de diferencia = promedio de 1 µM / promedio de Control. Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

5 z3)

NO/ONOO <sup>-</sup> (LA-419 1 µM)				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	1,22 (0,52)	0,7130	0,700
	G/T (18)	1,50 (0,77)		
	T/T (5)	1,62 (0,82)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	1,25 (0,52)	2,6416	0,267
	T/C (23)	1,53 (0,78)		
	C/C (4)	1,03 (0,36)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	1,43 (0,71)	3,4675	0,325
	b/a (10)	1,43 (0,65)		
	a/a (3)	0,96 (0,45)		
	c/c (1)	0,74 (0)		

Número de veces de diferencia = promedio de 1 µM / promedio de Control. Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

10 **Tablas aa1 - aa3)** Número de veces de diferencia de LA-419 5 µM – comparación entre homocigotos del alelo mayoritario y vehículos del alelo minoritario

**Número de veces de diferencia = (LA-419 5 µM)/(control)**

aa1)

<b>NO (LA-419 5 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Número de veces de diferencia (media ± dt)</b>	<b>Estadística de t</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	1,16 (0,06)	-1,9933	0,05†
	G/T y T/T (23)	1,13 (0,06)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	1,16 (0,06)	1,5779	0,12
	T/C y C/C (27)	1,13 (0,07)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	1,14 (0,07)	1,2136	0,231
	b/a, a/a, c/c (14)	1,16 (0,06)		

Número de veces de diferencia = promedio de 5 µM - promedio de Control. Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

aa2)

<b>ONOO<sup>-</sup> (LA-419 5 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Número de veces de diferencia (media ± dt)</b>	<b>Estadística de t</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	0,79 (0,07)	1,3923	0,17
	G/T y T/T (23)	0,82 (0,07)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	0,79 (0,08)	-0,8744	0,39
	T/C y C/C (27)	0,82 (0,06)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	0,81 (0,08)	-0,3555	0,724
	b/a, a/a, c/c (14)	0,81 (0,05)		

Número de veces de diferencia = promedio de 5 µM / promedio de Control. Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

5

aa3)

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (LA-419 5 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Número de veces de diferencia (media ± dt)</b>	<b>Estadística de t</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	1,48 (0,18)	-2,0935	0,042†
	G/T y T/T (23)	1,39 (0,13)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	1,49 (0,18)	1,6784	0,100
	T/C y C/C (27)	1,39 (0,13)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	1,42 (0,18)	0,5516	0,584
	b/a, a/a, c/c (14)	1,44 (0,13)		

Número de veces de diferencia = promedio de 5 µM / promedio de Control. Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

**Tablas bb1 - bb3)** Número de veces de diferencia de LA-419 1 µM – comparación entre homocigotos del alelo mayoritario y vehículos del alelo minoritario

$$\text{Número de veces de diferencia} = (\text{LA-419 1 } \mu\text{M})/(\text{control})$$

10

bb1)

<b>NO (LA-419 1 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Número de veces de diferencia (media ± dt)</b>	<b>Estadística de t</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	1,08 (0,19)	0,0100	0,99
	G/T y T/T (23)	1,18 (0,28)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	1,09 (0,18)	0,2111	0,83
	T/C y C/C (27)	1,15 (0,28)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	1,13 (0,23)	0,0000	1,000
	b/a, a/a, c/c (14)	1,13 (0,23)		

Número de veces de diferencia = promedio de 1 µM / promedio de Control. Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

bb2)

<b>ONOO<sup>-</sup> (LA-419 1 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Número de veces de diferencia (media ± dt)</b>	<b>Estadística de t</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	0,98 (0,27)	-1,3322	0,19
	G/T y T/T (23)	0,87 (0,26)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	0,95 (0,22)	1,4774	0,15
	T/C y C/C (27)	0,91 (0,31)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	0,90 (0,27)	0,7233	0,473
	b/a, a/a, c/c (14)	0,97 (0,30)		

Número de veces de diferencia = promedio de 1 µM / promedio de Control. Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

5

bb3)

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (LA-419 1 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Número de veces de diferencia (media ± dt)</b>	<b>Estadística de t</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	1,22 (0,52)	0,4508	0,654
	G/T y T/T (23)	1,53 (0,77)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	1,25 (0,52)	-0,6131	0,543
	T/C y C/C (27)	1,45 (0,75)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	1,43 (0,71)	-0,4781	0,635
	b/a, a/a, c/c (14)	1,28 (0,62)		

Número de veces de diferencia = promedio de 1 µM / promedio de Control. Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

Tablas cc1 - cc3) Número de veces de diferencia de LA-419 5 µM (combinación alélica individual)  
**Número de veces de diferencia = (LA-419 5 µM)/(control)**

cc1)

NO/ONOO <sup>-</sup> (LA-419 5 µM)				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	G/G + T/T (18)	1,17 (0,06)	4,6351	0,59
	G/G + T/C (8)	1,14 (0,07)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (4)	1,14 (0,05)		
	G/T + T/C (13)	1,13 (0,07)		
	G/T + C/C (1)	1,12 (0)		
	T/T + T/C (2)	1,12 (0,09)		
	T/T + C/C (3)	1,12 (0,07)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

5

cc2)

ONOO <sup>-</sup> (LA-419 5 µM)				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	G/G + T/T (18)	0,79 (0,08)	4,4377	0,62
	G/G + T/C (8)	0,80 (0,07)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (4)	0,79 (0,12)		
	G/T + T/C (13)	0,83 (0,04)		
	G/T + C/C (1)	0,85 (0)		
	T/T + T/C (2)	0,87 (0,06)		
	T/T + C/C (3)	0,77 (0,08)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

cc3)

NO/ONOO <sup>-</sup> (LA-419 5 µM)				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	G/G + T/T (18)	1,50 (0,18)	8,3116	0,216
	G/G + T/C (8)	1,44 (0,18)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (4)	1,47 (0,19)		
	G/T + T/C (13)	1,37 (0,11)		
	G/T + C/C (1)	1,32 (0)		
	T/T + T/C (2)	1,29 (0,01)		
	T/T + C/C (3)	1,46 (0,14)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

**Tablas dd1 - dd3** Número de veces de diferencia de LA-419 1 µM (combinación alélica individual)

Grupo de referencia = G/G + T/T

**Número de veces de diferencia = (LA-419 1 µM)/(control)**

5 **dd1)**

<b>NO (LA-419 1 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Número de veces de diferencia (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	G/G + T/T (18)	1,10 (0,20)	5,0913	0,53
	G/G + T/C (8)	1,03 (0,17)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (4)	1,08 (0,03)		
	G/T + T/C (13)	1,28 (0,33)		
	G/T + C/C (1)	0,86 (0)		
	T/T + T/C (2)	1,11 (0,36)		
	T/T + C/C (3)	1,07 (0,06)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

**dd2)**

<b>ONOO<sup>-</sup> (LA-419 1 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Número de veces de diferencia (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	G/G + T/T (18)	0,94 (0,23)	11,1807	0,08
	G/G + T/C (8)	1,07 (0,36)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (4)	0,98 (0,18)		
	G/T + T/C (13)	0,81 (0,15)		
	G/T + C/C (1)	1,77 (0)		
	T/T + T/C (2)	0,52 (0,11)		
	T/T + C/C (3)	0,89 (0,06)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

**dd3)**

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (LA-419 1 µM)</b>				
<b>Variable</b>	<b>Nivel (n)</b>	<b>Número de veces de diferencia (media ± dt)</b>	<b>Estadística de Chi-cuadrado</b>	<b>valor p</b>
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	G/G + T/T (18)	1,28 (0,57)	8,1332	0,229
	G/G + T/C (8)	1,07 (0,37)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (4)	1,12 (0,18)		
	G/T + T/C (13)	1,70 (0,81)		
	G/T + C/C (1)	0,49 (0)		
	T/T + T/C (2)	2,25 (1,17)		
	T/T + C/C (3)	1,20 (0,04)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

**Tablas ee1 - ee3** Número de veces de diferencia de LA-419 5 µM. Comparación entre homocigotos del alelo mayoritario y vehículos del alelo minoritario (combinación de referencia con respecto a todos los vehículos)

Grupo de referencia = G/G + T/T.

Combinación = G/G + T/C, G/G/ + C/C, G/T + T/T, G/T + T/C, G/T + C/C, T/T + T/C, T/T + C/C

**Número de veces de diferencia = (LA-419 5 µM)/(control)**

5 ee1)

NO (LA-419 5 µM)				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (18)	1,17 (0,06)	1,7317	0,09
	Combinación (31)	1,13 (0,06)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

ee2)

ONOO <sup>-</sup> ((LA-419 5 µM)				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (18)	0,79 (0,06)	-0,8607	0,39
	Combinación (31)	0,81 (0,07)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

ee3)

NO/ONOO <sup>-</sup> (LA-419 5 µM)				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (18)	1,50 (0,18)	1,5451	0,130
	Combinación (31)	1,40 (0,14)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

10 **Tablas ff1 - ff3)** Número de veces de diferencia de LA-419 1 µM. Comparación entre homocigotos del alelo mayoritario y vehículos del alelo minoritario (combinación de referencia con respecto a todos los vehículos)

Grupo de referencia = G/G + T/T.

15 Combinación = G/G + T/C, G/G/ + C/C, G/T + T/T, G/T + T/C, G/T + C/C, T/T + T/C, T/T + C/C

**Número de veces de diferencia = (LA-419 1 µM)/(control)**

ff1)

NO (LA-419 1 µM)				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (18)	1,10 (0,20)	0,5911	0,56
	Combinación (31)	1,14 (0,26)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

20 ff2)

ONOO <sup>-</sup> (LA-419 1 µM)				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (18)	0,94 (0,23)	0,9851	0,33
	Combinación (31)	0,92 (0,30)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

ff3)

NO/ONOO <sup>-</sup> (LA-419 1 µM)				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (18)	1,28 (0,57)	-0,0726	0,942
	Combinación (31)	1,41 ,(0,71)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

**Número de veces de diferencia dentro de la raza blanca**

Tablas gg1 - gg3) número de veces de diferencia en la raza blanca LA-419 5 µM – comparación entre genotipos

5

**Número de veces de diferencia = (LA-419 5 µM)/(control)**

gg1)

NO (LA-419 5 µM) Raza Blanca				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (10)	1,19 (0,07)	7,8918	0,02†
	G/T (13)	1,12 (0,05)		
	T/T (3)	1,11 (0,07)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (10)	1,17 (0,08)	3,7379	0,15
	T/C (15)	1,13 (0,06)		
	C/C (1)	1,08 (0)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (18)	1,13 (0,07)	1,1544	0,56
	b/a (5)	1,16 (0,06)		
	a/a (1)	1,17 (0)		

% de Control = promedio de 5 µM / promedio de Control. Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

gg2)

ONOO <sup>-</sup> (LA-419 5 µM) Raza Blanca				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (10)	0,81 (0,04)	1,6319	0,44
	G/T (13)	0,83 (0,06)		
	T/T (3)	0,80 (0,12)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (10)	0,82 (0,07)	3,2593	0,20
	T/C (15)	0,83 (0,04)		
	C/C (1)	0,67 (0)		

10

<b>ONOO<sup>-</sup> (LA-419 5 µM) Raza Blanca</b>				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (18)	0,82 (0,06)	0,4844	0,78
	b/a (5)	0,83 (0,05)		
	a/a (1)	0,85 (0)		

% de Control = promedio de 5 µM / promedio de Control. Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

gg3)

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (LA-419 5 µM) Raza Blanca</b>				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (10)	1,47 (0,12)	5,6513	0,06
	G/T (13)	1,34 (0,09)		
	T/T (3)	1,39 (0,17)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (10)	1,49 (0,14)	5,1960	0,07
	T/C(15)	1,35 (0,09)		
	C/C (1)	1,59 (0)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (18)	1,39 (0,13)	0,1518	0,93
	b/a (5)	1,39 (0,12)		
	a/a (1)	1,39 (0)		

Número de veces de diferencia = promedio de 5 µM / promedio de Control. Estadística de chi cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

- 5 **Tablas hh1 - hh3) número de veces de diferencia en la raza blanca LA-419 1 µM – comparación entre genotipos**  
**Número de veces de diferencia = (LA-419 1 µM)/(control)**

hh1)

<b>NO (LA-419 1 µM) Raza Blanca</b>				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (10)	1,21 (0,12)	3,6332	0,16
	G/T (13)	1,24 (0,33)		
	T/T (3)	1,08 (0,26)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (10)	1,20 (0,13)	3,1174	0,21
	T/C(15)	1,24 (0,32)		
	C/C (1)	1,02 (0)		

<b>NO (LA-419 1 µM) Raza Blanca</b>				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (18)	1,21 (0,25)	0,4540	0,80
	b/a (5)	1,28 (0,35)		
	a/a (1)	1,09 (0)		

Número de veces de diferencia = promedio de 1 µM / promedio de Control. Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

hh2)

<b>ONOO<sup>-</sup> (LA-419 1 µM) Raza Blanca</b>				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (10)	0,86 (0,18)	5,1185	0,08
	G/T (13)	0,83 (0,15)		
	T/T (3)	0,63 (0,19)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (10)	0,86 (0,18)	2,5840	0,27
	T/C(15)	0,79 (0,17)		
	C/C (1)	0,83 (0)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (18)	0,79 (0,20)	0,5404	0,76
	b/a (5)	0,85 (0,12)		
	a/a (1)	0,89 (0)		

Número de veces de diferencia = promedio de 1 µM / promedio de Control. Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

hh3)

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (LA-419 1 µM) Raza Blanca</b>				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (10)	1,52 (0,61)	2,7557	0,25
	G/T (13)	1,63 (0,82)		
	T/T (3)	1,90 (1,02)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (10)	1,50 (0,62)	0,1225	0,94
	T/C(15)	1,72 (0,84)		
	C/C (1)	123 (0)		

NO/ONOO <sup>-</sup> (LA-419 1 µM) Raza Blanca				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (18)	1,69 (0,80)	0,0640	0,97
	b/a (5)	1,58 (0,77)		
	a/a (1)	1,23 (0)		

Número de veces de diferencia = promedio de 1 µM / promedio de Control. Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

**Tablas ii1 - ii3)** número de veces de diferencia en la raza blanca LA-419 5 µM – comparación entre homocigotos del alelo mayoritario y vehículos del alelo minoritario

5

**Número de veces de diferencia = (LA-419 5 µM)/(control)**

ii1)

NO (5 µM) Raza blanca				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (10)	1,19 (0,07)	2,7670	0,01†
	G/T y T/T (16)	1,11 (0,05)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (10)	1,17 (0,08)	1,7656	0,09
	T/C y C/C (16)	1,12 (0,06)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (18)	1,13 (0,07)	1,0333	0,31
	b/a y a/a (6)	1,16 (0,06)		

Número de veces de diferencia = promedio de 5 µM / promedio de Control. Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

ii2)

ONOO <sup>-</sup> (5 µM) Raza blanca				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (10)	0,81 (0,04)	-1,1859	0,25
	G/T y T/T (16)	0,83 (0,07)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (10)	0,82 (0,07)	-0,3953	0,67
	T/C y C/C (16)	0,82 (0,06)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (18)	0,82 (0,06)	0,4333	0,67
	b/a y a/a (6)	0,83 (0,05)		

Número de veces de diferencia = promedio de 5 µM / promedio de Control. Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

10

ii3)

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (5 µM) Raza blanca</b>				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (10)	1,47 (0,12)	2,3454	0,027†
	G/T y T/T (16)	1,35 (0,10)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (10)	1,45 (0,14)	1,3967	0,17
	T/C y C/C (16)	1,36 (0,10)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (18)	1,39 (0,13)	0,2333	0,82
	b/a y a/a (6)	1,39 (0,11)		

Número de veces de diferencia = promedio de 5 µM / promedio de Control. Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

**Tablas jj1 - jj3)** número de veces de diferencia en la raza blanca LA-419 1 µM – comparación entre homocigotos del alelo mayoritario y vehiculos del alelo minoritario

5

**Número de veces de diferencia = (LA-419 1 µM)/(control)**

jj1)

<b>NO (1 µM) Raza blanca</b>				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (10)	1,21 (0,12)	1,7129	0,10
	G/T y T/T (16)	1,21 (0,32)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (10)	1,20 (0,13)	1,0804	0,29
	T/C y C/C (16)	1,22 (0,31)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (18)	1,21 (0,25)	0,3667	0,72
	b/a y a/a (6)	1,25 (0,33)		

Número de veces de diferencia = promedio de 1 µM / promedio de Control. Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

jj2)

<b>ONOO<sup>-</sup> (1 µM) Raza blanca</b>				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (10)	0,86 (0,18)	1,0804	0,29
	G/T y T/T (16)	0,79 (0,17)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (10)	0,86 (0,18)	1,5021	0,15
	T/C y C/C (16)	0,79 (0,17)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (18)	0,79 (0,20)	0,7000	0,49
	b/a y a/a (6)	0,86 (0,10)		

Número de veces de diferencia = promedio de 1 µM / promedio de Control. Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

10

jj3)

NO/ONOO <sup>-</sup> (1 µM) Raza blanca				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (10)	1,52 (0,61)	0,8696	0,39
	G/T y T/T (16)	1,68 (0,83)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (10)	1,50 (0,62)	-0,0264	0,98
	T/C y C/C (16)	1,69 (0,82)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (18)	1,69 (0,80)	-0,1667	0,87
	b/a y a/a (6)	1,52 (0,70)		

Número de veces de diferencia = promedio de 1 µM / promedio de Control. Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

**Tablas kk1 - kk3)** Número de veces de diferencia en raza blanca de LA-419 5 µM (combinación alélica individual)  
Grupo de referencia = G/G + T/T

5

**Número de veces de diferencia = (LA-419 5 µM)/(control)**

kk1)

NO (LA-419 5 µM) Raza blanca				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	G/G + T/T (7)	1,19 (0,08)	8,9129	0,11
	G/G + T/C (3)	1,19 (0,02)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (3)	1,14 (0,06)		
	G/T + T/C (10)	1,11 (0,05)		
	G/T + C/C (0)	-		
	T/T + T/C (2)	1,12 (0,09)		
	T/T + C/C (1)	1,08 (0)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

kk2)

ONOO <sup>-</sup> (LA-419 5 µM) Raza blanca				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	G/G + T/T (7)	0,81 (0,04)	5,6036	0,35
	G/G + T/C (3)	0,81 (0,03)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (3)	0,83 (0,11)		
	G/T + T/C (10)	0,84 (0,04)		
	G/T + C/C (0)	-		
	T/T + T/C (2)	0,87 (0,06)		
	T/T + C/C (1)	0,67 (0)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

kk3)

NO/ONOO <sup>-</sup> (LA-419 5 µM) Raza blanca				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	G/G + T/T (7)	1,47 (0,14)	11,0915	0,0496†
	G/G + T/C (3)	1,47 (0,08)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (3)	1,39 (0,14)		
	G/T + T/C (10)	1,33 (0,06)		
	G/T + C/C (0)	-		
	T/T + T/C (2)	1,29 (0,01)		
	T/T + C/C (1)	1,59 (0)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

**Tablas II1 - II3)** Número de veces de diferencia en raza blanca de LA-419 1 µM (combinación alélica individual)  
Grupo de referencia = G/G + T/T

**Número de veces de diferencia = (LA-419 1 µM)/(control)**

5

II1)

NO (LA-419 1 µM) Raza blanca				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	G/G + T/T (7)	1,25 (0,12)	5,7933	0,33
	G/G + T/C (3)	1,13 (0,03)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (3)	1,08 (0,03)		
	G/T + T/C (10)	1,29 (0,37)		
	G/T + C/C (0)	-		
	T/T + T/C (2)	1,11 (0,36)		
	T/T + C/C (1)	1,02 (0)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

II2)

ONOO <sup>-</sup> (LA-419 1 µM) Raza blanca				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	G/G + T/T (7)	0,84 (0,22)	6,2678	0,28
	G/G + T/C (3)	0,89 (0,02)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (3)	0,90 (0,06)		
	G/T + T/C (10)	0,81 (0,16)		
	G/T + C/C (0)	-		
	T/T + T/C (2)	0,52 (0,11)		
	T/T + C/C (1)	0,83 (0)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

II3)

NO/ONOO <sup>-</sup> (LA-419 1 µM) Raza blanca				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	G/G + T/T (7)	1,63 (0,72)	4,3243	0,50
	G/G + T/C (3)	1,27 (0,04)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (3)	1,21 (0,04)		
	G/T + T/C (10)	1,75 (0,91)		
	G/T + C/C (0)	-		
	T/T + T/C (2)	2,25 (1,17)		
	T/T + C/C (1)	1,23 (0)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

**Tablas mm1 - mm3)** Número de veces de diferencia de Raza blanca de LA-419 5 µM. Comparación entre homocigotos del alelo mayoritario y vehículos del alelo minoritario (combinación de referencia con respecto a todos los vehículos)

5

Grupo de referencia = G/G + T/T.

Combinación = G/G + T/C, G/G/ + C/C, G/T + T/T, G/T + T/C, G/T + C/C, T/T + T/C, T/T + C/C

**Número de veces de diferencia = (LA-419 5 µM)/(control)**

10

mm1)

NO (LA-419 5 µM) Raza blanca				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (7)	1,19 (0,08)	1,9076	0,068
	Combinación (19)	1,13 (0,06)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

mm2)

ONOO <sup>-</sup> (LA-419 5 µM) Raza blanca				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (7)	0,81 (0,04)	-0,9249	0,36
	Combinación (19)	0,83 (0,06)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

mm3)

NO/ONOO <sup>-</sup> (LA-419 5 µM) Raza blanca				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (7)	1,47 (0,14)	1,5608	0,13
	Combinación (19)	1,37 (0,10)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

15

**Tablas nn1 - nn3)** Número de veces de diferencia de Raza blanca de LA-419 1 µM. Comparación entre homocigotos del alelo mayoritario y vehículos del alelo minoritario (combinación de referencia con respecto a todos los vehículos)

Grupo de referencia = G/G + T/T.

Combinación = G/G + T/C, G/G/ + C/C, G/T + T/T, G/T + T/C, G/T + C/C, T/T + T/C, T/T + C/C  
**Número de veces de diferencia = (LA-419 1 µM)/(control)**

nn1)

<b>NO (LA-419 1 µM) Raza blanca</b>				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (7)	1,25 (0,12)	1,8498	0,076
	Combinación (19)	1,20 (0,29)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

5

nn2)

<b>ONOO<sup>-</sup> (LA-419 1 µM) Raza blanca</b>				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (7)	0,84 (0,22)	0,9827	0,34
	Combinación (19)	0,81 (0,16)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

nn3)

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (LA-419 1 µM) Raza blanca</b>				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (7)	1,63 (0,72)	0,6937	0,49
	Combinación (19)	1,61 (0,77)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

10 **Número de veces de Diferencia de Alelo Secundario con respecto a Alelo Principal y Heterocigotos**  
**Tablas oo1 - oo3** Número de veces de Diferencia de Alelo Secundario con respecto a Alelo Principal y Heterocigotos  
 LA-419 5 µM

**Número de veces de diferencia = (LA-419 5 µM)/(control)**

oo1)

<b>NO (5 µM) Alelo Secundario con respecto a Alelo Principal y Heterocigotos</b>				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	T/T (5)	1,12 (0,07)	-1,0734	0,288
	G/G y G/T (44)	1,15 (0,06)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	C/C (4)	1,12 (0,06)	-1,0772	0,287
	T/T y T/C (45)	1,15 (0,06)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	a/a (3)	1,14 (0,04)	-0,2048	0,839
	b/b, b/a, c/c (42)	1,14 (0,07)		

Número de veces de cambio = promedio de 5 µM / promedio de Control. Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

15

oo2)

<b>ONOO<sup>-</sup> (5 µM) Alelo Secundario con respecto a Alelo Principal y Heterocigotos</b>				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	T/T (5)	0,81 (0,08)	0,3798	0,706
	G/G y G/T (44)	0,80 (0,07)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	C/C (4)	0,79 (0,08)	-0,0913	0,928
	T/T y T/C (45)	0,81 (0,07)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	a/a (3)	0,83 (0,03)	0,7508	0,457
	b/b, b/a, c/c (42)	0,81 (0,07)		

Número de veces de diferencia = promedio de 5 µM / promedio de Control. Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

oo3)

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (5 µM) Alelo Secundario con respecto a Alelo Principal y Heterocigotos</b>				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	T/T (5)	1,39 (0,13)	-0,8753	0,386
	G/G y G/T (44)	1,44 (0,16)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	C/C (4)	1,42 (0,13)	-0,0913	0,928
	T/T y T/C (45)	1,44 (0,16)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	a/a (3)	1,37 (0,04)	-0,3868	0,701
	b/b, b/a, c/c (42)	1,43 (0,17)		

Número de veces de diferencia = promedio de 5 µM / promedio de Control. Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

- 5 **Tablas pp1 - pp3)** Número de veces de Diferencia de Alelo Secundario con respecto a Alelo Principal y Heterocigotos LA-419 1 µM

$$\text{Número de veces de diferencia} = (\text{LA-419 } 1 \mu\text{M})/(\text{control})$$

pp1)

<b>NO (1 µM) Alelo Secundario con respecto a Alelo Principal y Heterocigotos</b>				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	T/T (5)	1,07 (0,19)	-0,6771	0,502
	G/G y G/T (44)	1,13 (0,25)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	C/C (4)	1,02 (0,12)	-1,4058	0,166
	T/T y T/C (45)	1,14 (0,25)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	a/a (3)	0,95 (0,25)	-0,9783	0,333
	b/b, b/a, c/c (42)	0,95 (0,25)		

Número de veces de diferencia = promedio de 1 µM / promedio de Control. Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

pp2)

<b>ONOO<sup>-</sup> (1 μM) Alelo Secundario con respecto a Alelo Principal y Heterocigotos</b>				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	T/T (5)	0,75 (0,21)	-1,4368	0,157
	G/G y G/T (44)	0,95 (0,27)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	C/C (4)	1,11 (0,44)	0,8581	0,395
	T/T y T/C (45)	0,91 (0,25)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	a/a (3)	1,10 (0,34)	1,0238	0,312
	b/b, b/a, c/c (42)	0,91 (0,27)		

Número de veces de diferencia = promedio de 1 μM / promedio de Control. Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

pp3)

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (1 μM) Alelo Secundario con respecto a Alelo Principal y Heterocigotos</b>				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	T/T (5)	1,62 (0,82)	0,8092	0,422
	G/G y G/T (44)	1,34 (0,64)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	C/C (4)	1,03 (0,36)	-1,2598	0,214
	T/T y T/C (45)	1,39 (0,67)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	a/a (3)	0,96 (0,45)	-1,1148	0,271
	b/b, b/a, c/c (42)	1,42 (0,69)		

Número de veces de diferencia = promedio de 1 μM / promedio de Control. Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

- 5 **Tablas qq1 - qq3)** Número de veces de diferencia de LA-419 5 μM. Comparación entre homocigoto del alelo minoritario y alelo mayoritario y heterocigotos (referencia con respecto a combinación).

Grupo de referencia = T/T + C/C.

Combinación = G/G + T/T, G/G/ + T/C, G/G + C/C, G/T + T/T, G/T + T/C, G/T + C/C, T/T + T/C

10

**Número de veces de diferencia = (LA-419 5 μM)/(control)**

qq1)

<b>NO (LA-419 5 μM) Alelo Secundario con respecto a Alelo Principal y Heterocigotos</b>				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (3)	1,12 (0,07)	-0,8549	0,397
	Combinación (46)	1,14 (0,06)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

qq2)

<b>ONOO<sup>-</sup> (LA-419 5 μM) Alelo Secundario con respecto a Alelo Principal y Heterocigotos</b>				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (3)	0,77 (0,08)	-0,5630	0,576
	Combinación (46)	0,81 (0,07)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

qq3)

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (LA-419 5 μM) Alelo Secundario con respecto a Alelo Principal y Heterocigotos</b>				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (3)	1,46 (0,14)	0,3545	0,725
	Combinación (46)	1,44 (0,16)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

- 5 **Tablas rr1 - rr3** Número de veces de diferencia de LA-419 1 μM. Comparación entre homocigoto del alelo minoritario y alelo mayoritario y heterocigotos (referencia con respecto a combinación).

Grupo de referencia = T/T + C/C.

Combinación = G/G + T/T, G/G/ + T/C, G/G + C/C, G/T + T/T, G/T + T/C, G/T + C/C, T/T + T/C

10

**Número de veces de diferencia = (LA-419 1 μM)/(control)**

rr1)

<b>NO (LA-419 1 μM) Alelo Secundario con respecto a Alelo Principal y Heterocigotos</b>				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (3)	1,07 (0,06)	-0,7715	0,444
	Combinación (46)	1,13 (0,25)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

rr2)

<b>ONOO<sup>-</sup> (LA-419 1 μM) Alelo Secundario con respecto a Alelo Principal y Heterocigotos</b>				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (3)	0,89 (0,06)	0,0209	0,984
	Combinación (46)	0,93 (0,28)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

15

rr3)

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (LA-419 1 μM) Alelo Secundario con respecto a Alelo Principal y Heterocigotos</b>				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (3)	1,20 (0,04)	-0,5213	0,605
	Combinación (46)	1,37 (0,68)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

**Abundancia de proteína de eNOS**

**Tabla ss)** % de cambio de eNOS, respuesta media para todos los genotipos y razas (LA-419 5 µM)  
 % de Cambio = (promedio de 5 µM - promedio de control)/(promedio de control) \*100

5 ss)

<b>Abundancia de proteína de eNOS (LA-419 5 µM)</b>				
Variable	Nivel (n)	% de Cambio (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	-1,07 (8,07)	0,0050	0,998
	G/T (18)	-0,79 (7,54)		
	T/T (5)	-1,54 (6,56)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	-0,64 (5,88)	3,0416	0,219
	T/C (23)	-0,37 (9,0)		
	C/C (4)	-6,82 (6,09)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	-1,78 (6,88)	1,5653	0,667
	b/a (10)	0,68 (9,65)		
	a/a (3)	1,11 (10,89)		
	c/c (1)	-5,66 (0)		
<b>Raza</b>				
	Asiática (1)	-17,56 (0)	15,1070	0,01†
	Negra (12)	-5,95 (6,82)		
	Blanca (26)	2,50 (6,89)		
	Blanca/Negra (2)	-4,89 (0,49)		
	Hispana (6)	-1,16 (4,99)		
	No Informada (2)	-4,62 (0,81)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

**Tablas tt1 - tt2)** Efecto del genotipo en eNOS dentro del grupo de control y LA-419 5 µM; abundancia de proteína, pg/ug de proteína total

10 tt1)

<b>Abundancia de proteína de eNOS (control)</b>				
Variable	Nivel (n)	pg/ug (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	6,32 (1,45)	1,4382	0,487
	G/T (18)	5,82 (1,33)		
	T/T (5)	5,87 (1,83)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	6,19 (1,43)	2,9222	0,232
	T/C (23)	5,79 (1,38)		
	C/C (4)	7,22 (1,54)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	5,89 (1,29)	3,2139	0,360
	b/a (10)	5,97 (1,67)		
	a/a (3)	7,22 (1,85)		
	c/c (1)	7,83 (0)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

tt2)

Abundancia de proteína de eNOS ((LA-419 5 µM)				
Variable	Nivel (n)	pg/ug (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	6,20 (1,31)	1,7547	0,416
	G/T (18)	5,73 (1,17)		
	T/T (5)	5,69 (1,44)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	6,11 (1,26)	2,7507	0,253
	T/C (23)	5,73 (1,29)		
	C/C (4)	6,67 (1,16)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	5,75 (1,13)	4,6691	0,198
	b/a (10)	5,95 (1,56)		
	a/a (3)	7,17 (1,19)		
	c/c (1)	7,39 (0)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

**Tablas uu1 - uu3)** Efecto del genotipo en la abundancia de proteína eNOS (pg/ug de proteína total) dentro del grupo de control y LA-419 5 µM – comparación entre homocigotos del alelo mayoritario y vehículos del alelo minoritario

5

uu1)

Abundancia de proteína de eNOS (control) Vehículo de Alelo Principal con respecto a Alelo Secundario				
Variable	Nivel (n)	pg/ug (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	6,32 (1,45)	-1,1519	0,255
	G/T y T/T (23)	5,83 (1,41)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T(22)	6,19 (1,43)	0,4523	0,653
	T/C y C/C (27)	6,01 (1,47)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	5,89 (1,29)	0,8949	0,376
	b/a, a/a, c/c (14)	6,37 (1,71)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

uu2)

Abundancia de proteína de eNOS (5 µM) Vehículo de Alelo Principal con respecto a Alelo Secundario				
Variable	Nivel (n)	pg/ug (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	6,20 (1,31)	-1,2922	0,203
	G/T y T/T (23)	5,72 (1,20)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	6,11 (1,26)	0,8945	0,376
	T/C y C/C (27)	5,87 (1,30)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	5,75 (1,13)	1,0910	0,281
	b/a, a/a, c/c (14)	6,31 (1,50)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

**Tablas vv1 - vv2)** Efecto del genotipo en la abundancia de proteína de eNOS (pg/ug de proteína total) dentro del grupo de control y LA-419 5 µM (Combinación alélica individual).

Grupo de referencia = G/G + T/T

5

**vv1)**

<b>abundancia de proteína de eNOS (control)</b>				
Variable	Nivel (n)	pg/ug (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T + T786C</b>				
	G/G + T/T (18)	6,26 (1,42)	8,4968	0,204
	G/G + T/C (8)	6,44 (1,61)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (4)	5,85 (1,64)		
	G/T + T/C (13)	5,62 (1,15)		
	G/T + C/C (1)	8,24 (0)		
	T/T + T/C (2)	4,36 (0,32)		
	T/T + C/C (3)	6,88 (1,69)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

**vv2)**

<b>abundancia de proteína de eNOS (LA-419 5 µM)</b>				
Variable	Nivel (n)	pg/ug (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T + T786C</b>				
	G/G + T/T (18)	6,17 (1,24)	6,7528	0,344
	G/G + T/C (8)	6,27 (1,56)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (4)	5,82 (1,49)		
	G/T + T/C (13)	5,59 (1,08)		
	G/T + C/C (1)	7,25 (0)		
	T/T + T/C (2)	4,52 (0,30)		
	T/T + C/C (3)	6,47 (1,34)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

10 **Tablas xx1 - xx2)** Efecto del genotipo en la abundancia de proteína de eNOS (pg/ug de proteína total) dentro del grupo de control y LA-419 5 µM. Comparación entre homocigoto del alelo minoritario y heterocigotos del alelo mayoritario (referencia con respecto a combinación).

Grupo de referencia = T/T + C/C

15 Combinación = G/G + T/T, G/G + T/C, G/G/ + C/C, G/T + T/T, G/T + T/C, G/T + C/C, T/T + T/C

**xx1)**

<b>Abundancia de proteína de eNOS (control)</b>				
Variable	Nivel (n)	pg/ug (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (18)	6,26 (1,42)	0,5911	0,557
	Combinación (31)	5,99 (1,46)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

xx2)

Abundancia de proteína de eNOS (LA-419 5 µM)				
Variable	Nivel (n)	pg/ug (media ± dt)	Estadística de t	valor p
Genotipo	Referencia (18)	6,17 (1,24)	0,9436	0,350
	Combinación (31)	5,86 (1,30)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

**Tabla yy)** abundancia de proteína de eNOS (pg/ug de proteína total), aumento neto en LA-419 5 µM con respecto al control – comparación entre genotipos

5

yy)

Abundancia de proteína de eNOS (LA-419 5 µM)				
Variable	Nivel (n)	Aumento neto en pg/ug (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
Variante de G894T	G/G (26)	-0,12 (0,50)	0,1444	0,930
	G/T (18)	-0,08 (0,46)		
	T/T (5)	-0,18 (0,45)		
Variante de T-786C	T/T (22)	-0,08 (0,36)	3,7371	0,154
	T/C (23)	-0,06 (0,54)		
	C/C (4)	-0,55 (0,47)		
Variante de Intrón 4	b/b (31)	-0,14 (0,45)	1,8758	0,599
	b/a (10)	-0,02 (0,56)		
	a/a (3)	-0,05 (0,69)		
	c/c (1)	-0,44 (0)		

Aumento neto = promedio de 5 µM - promedio de Control. Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

**Tabla zz)** abundancia de proteína de eNOS (pg/ug de proteína total), aumento neto en LA-419 5 µM con respecto al control – comparación entre homocigoto del alelo mayoritario y vehículos del alelo minoritario

10

zz)

Abundancia de proteína de eNOS (LA-419 5 µM)				
Variable	Nivel (n)	Aumento neto en pg/ug (media ± dt)	Estadística de t	valor p
Variante de G894T	G/G (26)	-0,12 (0,50)	0,1503	0,881
	G/T y T/T (23)	-0,10 (0,45)		
Variante de T-786C	T/T (22)	-0,08 (0,36)	-0,1106	0,912
	T/C y C/C (27)	-0,13 (0,55)		
Variante de Intrón 4	b/b (31)	-0,14 (0,45)	0,4536	0,652
	b/a, a/a, c/c (14)	-0,05 (0,55)		

Aumento neto = promedio de 5 µM - promedio de Control. Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

**Tabla A)** abundancia de proteína de eNOS (pg/ug de proteína total), aumento neto in LA-419 5 µM con respecto al control (Combinación alélica individual). Grupo de referencia = G/G + T/T

A)

abundancia de proteína de eNOS (aumento de LA-419 5 µM con respecto al control)				
Variable	Nivel (n)	Aumento neto en pg/ug (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T + T786C</b>				
	G/G + T/T (18)	-0,09 (0,35)	5,1150	0,5292
	G/G + T/C (8)	-0,17 (0,77)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (4)	-0,03 (0,46)		
	G/T + T/C (13)	-0,03 (0,42)		
	G/T + C/C (1)	-0,99 (0)		
	T/T + T/C (2)	0,17 (0,02)		
	T/T + C/C (3)	-0,41 (0,46)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

5

**Tabla B)** abundancia de proteína de eNOS (pg/ug de proteína total), aumento neto en LA-419 5 µM con respecto al control. Comparación entre homocigoto del alelo mayoritario y vehículos del alelo minoritario (combinación de referencia con respecto a todos los vehículos).

10

Grupo de referencia = G/G + T/T,  
Combinación = G/G + T/C, G/G/ + C/C, G/T + T/T, G/T + T/C, G/T + C/C, T/T + T/C, T/T + C/C

B)

Abundancia de proteína de eNOS (aumento de LA-419 5 µM con respecto al control)				
Variable	Nivel (n)	Aumento neto en pg/ug (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (18)	-0,09 (0,35)	-0,1970	0,845
	Combinación (31)	-0,12 (0,53)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

15

**Tabla C)** Número de veces de diferencia de abundancia de proteína de eNOS, LA-419 5 µM – comparación entre genotipos

**Número de veces de diferencia = (LA-419 5 µM)/(control)**

C)

Abundancia de proteína de eNOS (LA-419 5 µM)				
Variable	Nivel (n)	número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	1,00 (0,08)	0,0050	0,998
	G/T (18)	0,99 (0,08)		
	T/T (5)	0,98 (0,07)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	0,99 (0,06)	3,0416	0,218
	T/C (23)	1,00 (0,09)		
	C/C (4)	0,93 (0,06)		

20

<b>Abundancia de proteína de eNOS (LA-419 5 µM)</b>				
Variable	Nivel (n)	número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	0,98 (0,07)	1,5653	0,667
	b/a (10)	1,01 (0,10)		
	a/a (3)	1,01 (0,11)		
	c/c (1)	0,94 (0)		

Número de veces de diferencia = promedio de 5 µM / promedio de Control. Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

**Tabla D)** Número de veces de diferencia de abundancia de proteína de eNOS, LA-419 5 µM – comparación entre homocigotos del alelo mayoritario y vehículos del alelo minoritario

5

**Número de veces de diferencia = (LA-419 5 µM)/(control)**

D)

<b>Abundancia de proteína de eNOS (5 µM)</b>				
Variable	Nivel (n)	número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (26)	0,99 (0,08)	0,0000	1,000
	G/T y T/T (23)	0,99 (0,07)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (22)	0,99 (0,06)	0,0000	1,000
	T/C y C/C (27)	0,99 (0,09)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	0,98 (0,07)	0,6497	0,519
	b/a, a/a, c/c (14)	1,00 (0,09)		

Número de veces de diferencia = promedio de 5 µM / promedio de Control. Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

**Tabla E)** Número de veces de diferencia de abundancia de proteína de eNOS, LA-419 5 µM (Combinación alélica individual)

10

Grupo de referencia = G/G + T/T

**Número de veces de diferencia = (LA-419 5 µM)/(control)**

E)

<b>Abundancia de proteína de eNOS (LA-419 5 µM)</b>				
Variable	Nivel (n)	número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	G/G + T/T (18)	0,99 (0,06)	4,6815	0,585
	G/G + T/C (8)	0,98 (0,12)		
	G/G + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (4)	1,00 (0,08)		
	G/T + T/C (13),	1,00 (0,07)		
	G/T + C/C (1)	0,88 (0)		
	T/T + T/C (2)	1,04 (0,01)		
	T/T + C/C (3)	0,95 (0,06)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

15

**Tabla F)** Número de veces de diferencia abundancia de proteína de eNOS, LA-419 5 µM. Comparación entre homocigoto del alelo mayoritario y vehículos del alelo minoritario (combinación de referencia frente a todos los vehículos).

- 5 Grupo de referencia = G/G + T/T,  
 Combinación = G/G + T/C, G/G/ + C/C, G/T + T/T, G/T + T/C, G/T + C/C, T/T + T/C, T/T + C/C  
**Número de veces de diferencia = (LA-419 5 µM)/(control)**

F)

Abundancia de proteína de eNOS (LA-419 5 µM)				
Variable	Nivel (n)	número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (18)	0,99 (0,06)	-0,0518	0,959
	Combinación (31)	0,99 (0,09)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

- 10 **Tabla G)** Número de veces de diferencia de abundancia de proteína de eNOS, LA-419 5 µM. Alelo Secundario con respecto a Alelo Principal y Heterocigotos

**Número de veces de diferencia = (LA-419 5 µM)/(control)**

- 15 G)

Abundancia de proteína de eNOS (LA-419 5 µM) Homocigotos de Alelo Secundario con respecto a Homocigotos de Alelo Principal más Heterocigotos				
Variable	Nivel (n)	número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	T/T (5)	0,98 (0,07)	-0,0495	0,961
	G/G y G/T (44)	0,99 (0,08)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	C/C(4)	0,93 (0,06)	-1,6614	0,103
	T/T y T/C (45)	0,99 (0,08)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	a/a(3)	1,01 (0,11)	0,1138	0,910
	b/b, b/a, c/c (42)	0,99 (0,08)		

Número de veces de diferencia = promedio de 5 µM - promedio de Control. Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

- 20 **Tabla H)** Número de veces de diferencia de abundancia de proteína de eNOS, LA-419 5 µM. Comparación entre homocigotos del alelo minoritario y homocigotos del alelo mayoritario más heterocigotos (referencia con respecto a combinación).

Grupo de referencia = T/T + C/C  
 Combinación = G/G + T/T, G/G + T/C, G/G/ + C/C, G/T + T/T, G/T + T/C, G/T + C/C, T/T + T/C  
**Número de veces de diferencia = (LA-419 5 µM)/(control)**

H)

Abundancia de proteína de eNOS (LA-419 5 µM) Homocigotos de Alelo Secundario con respecto a Homocigotos de Alelo Principal más Heterocigotos				
Variable	Nivel (n)	número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (3)	0,95 (0,06)	-0,9800	0,332
	Combinación (46)	0,99 (0,08)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

- 25

**Tabla I)** número de veces de diferencia en la raza blanca para abundancia de proteína de eNOS, LA-419 5 µM. Comparación entre genotipos:

$$\text{Número de veces de diferencia} = (\text{LA-419 5 } \mu\text{M})/(\text{control})$$

5

I)

Abundancia de proteína de eNOS (LA-419 5 µM) Raza Blanca				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (10)	1,06 (0,05)	3,8950	0,14
	G/T(13)	1,00 (0,08)		
	T/T (3)	1,03 (0,02)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T(10)	1,03 (0,06)	0,0564	0,97
	T/C (15)	1,02 (0,08)		
	C/C (1)	1,01 (0)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (18)	1,00 (0,06)	6,5351	0,038†
	b/a (5)	1,07 (0,06)		
	a/a (1)	1,14 (0)		

Número de veces de diferencia = promedio de 5 µM / promedio de Control. Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

**Tabla J)** número de veces de diferencia en la raza blanca para abundancia de proteína de eNOS, LA-419 5 µM. Comparación entre homocigotos del alelo mayoritario y vehículos del alelo minoritario

$$\text{Número de veces de diferencia} = (\text{LA-419 5 } \mu\text{M})/(\text{control})$$

10

J)

Abundancia de proteína de eNOS (5 µM) Raza Blanca				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Variante de G894T</b>				
	G/G (10)	1,06 (0,05)	1,7656	0,09
	G/T y T/T (16)	1,01 (0,07)		
<b>Variante de T-786C</b>				
	T/T (10)	1,03 (0,06)	0,1318	0,90
	T/C y C/C (16)	1,02 (0,08)		
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (18)	1,00 (0,06)	2,4333	0,02†
	b/a y a/a (6)	1,08 (0,06)		

Número de veces de diferencia = promedio de 5 µM / promedio de Control. Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

**Tabla K)** Número de veces de diferencia en raza blanca para abundancia de proteína de eNOS, LA-419 5 µM (combinación alélica individual)

Grupo de referencia = G/G + T/T

$$\text{Número de veces de diferencia} = (\text{LA-419 5 } \mu\text{M})/(\text{control})$$

15

K)

Abundancia de proteína de eNOS (LA-419 5 µM) Raza Blanca				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de Chi-cuadrado	valor p
<b>Variante de G894T + T-786C</b>				
	G/G + T/T (7)	1,04 (0,04)	6,0565	0,30
	G/G + T/C (3)	1,10 (0,05)		
	G/G/ + C/C (0)	-		
	G/T + T/T (3)	1,02 (0,09)		
	G/T + T/C,(10)	1,00 (0,08)		
	G/T + C/C (0)	-		
	T/T + T/C (2)	1,04 (0,01)		
	T/T + C/C (1)	1,01 (0)		

Estadística de Chi-cuadrado generada a partir del ensayo de Kruskal-Wallis para ANOVA No paramétrico

**Tabla L)** Número de veces de diferencia en raza blanca para abundancia de proteína de eNOS, LA-419 5 µM. Comparación entre homocigoto del alelo mayoritario y vehículos del alelo minoritario (combinación de referencia con respecto a todos los vehículos)

5

Grupo de referencia = G/G + T/T,

Combinación = G/G + T/C, G/G/ + C/C, G/T + T/T, G/T + T/C, G/T + C/C, T/T + T/C, T/T + C/C

**Número de veces de diferencia = (LA-419 5 µM)/(control)**

10

L)

Abundancia de proteína de eNOS (LA-419 5 µM) Raza Blanca				
Variable	Nivel (n)	Número de veces de diferencia (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Genotipo</b>				
	Referencia (7)	1,04 (0,04)	0,4625	0,65
	Combinación (19)	1,02 (0,08)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

#### ANÁLISIS DE INTRÓN 4: Tablas Extra

15

**Tabla M1 - M4)** % de Cambio en Intrón 4, LA-419 5 µM. Comparación entre homocigotos del alelo mayoritario y vehículos del alelo minoritario

M1)

NO (LA-419 5 µM)				
Variable	Nivel (n)	% de Cambio (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Variante de intrón 4</b>				
	b/b (31)	13,52 (6,80)	1,2136	0,231
	b/a, a/a, c/c (14)	16,16 (6,09)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

M2)

ONOO <sup>-</sup> (LA-419 5 µM)				
Variable	Nivel (n)	% de Cambio (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	-19,19 (7,76)	-0,3555	0,724
	b/a, a/a, c/c (14)	-19,27 (5,27)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

20

**M3)**

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (LA-419 5 μM)</b>				
Variable	Nivel (n)	% de Cambio (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	42,24 (17,73)	0,5516	0,584
	b/a, a/a, c/c (14)	44,37 (12,85)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

**M4)**

<b>Abundancia de proteína de eNOS (LA-419 5 μM)</b>				
Variable	Nivel (n)	% de Cambio (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	-1,78 (6,88)	0,6497	0,519
	b/a, a/a, c/c (14)	0,32 (9,26)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

- 5 **Tablas N1 - N3)** % de Cambio en Intrón 4, LA-419 1 μM. Comparación entre homocigotos del alelo mayoritario y vehículos del alelo minoritario

**N1)**

<b>NO (LA-419 1 μM)</b>				
Variable	Nivel (n)	% de Cambio (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	13,46 (23,13)	0,0000	1,00
	b/a, a/a, c/c (14)	11,76 (29,57)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

10

**N2)**

<b>ONOO<sup>-</sup> (LA-419 1 μM)</b>				
Variable	Nivel (n)	% de Cambio (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	-10,24 (27,17)	0,7233	0,473
	b/a, a/a, c/c (14)	-2,68 (29,78)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

**N3)**

<b>NO/ONOO<sup>-</sup> (LA-419 1 μM)</b>				
Variable	Nivel (n)	% de Cambio (media ± dt)	Estadística de t	valor p
<b>Variante de Intrón 4</b>				
	b/b (31)	43,27 (71,09)	-0,4781	0,635
	b/a, a/a, c/c (14)	28,01 (62,22)		

Estadística de t generada a partir del ensayo U de Mann-Whitney No paramétrico

**Referencias**

15

- Patente de Estados Unidos n.º 4.582.788
- Patente de Estados Unidos n.º 4.627.429
- Patente de Estados Unidos n.º 4.659.774
- Patente de Estados Unidos n.º 4.683.194
- Patente de Estados Unidos n.º 4.683.195
- Patente de Estados Unidos n.º 4.683.202
- Patente de Estados Unidos n.º 4.683.202

20

Patente de Estados Unidos n.º 4.683.202  
 Patente de Estados Unidos n.º 4.784.857  
 Patente de Estados Unidos n.º 4.800.159  
 Patente de Estados Unidos n.º 4.816.571  
 5 Patente de Estados Unidos n.º 4.883.750  
 Patente de Estados Unidos n.º 4.946.773  
 Patente de Estados Unidos n.º 4.959.463  
 Patente de Estados Unidos n.º 4.965.188  
 10 Patente de Estados Unidos n.º 5.126.145  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.130.238  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.141.813  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.169.766  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.264.566  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.279.721  
 15 Patente de Estados Unidos n.º 5.428.148  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.554.744  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.574.146  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.602.244  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.605.798  
 20 Patente de Estados Unidos n.º 5.645.897  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.662.925  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.705.629  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.788.983  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.840.873  
 25 Patente de Estados Unidos n.º 5.843.640  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.843.650  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.843.651  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.843.663  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.846.708  
 30 Patente de Estados Unidos n.º 5.846.709  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.846.717  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.846.726  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.846.729  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.846.783  
 35 Patente de Estados Unidos n.º 5.849.481  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.849.483  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.849.486  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.849.487  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.849.497  
 40 Patente de Estados Unidos n.º 5.849.546  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.849.547  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.851.770  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.851.772  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.853.990  
 45 Patente de Estados Unidos n.º 5.853.992  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.853.993  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.856.092  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.858.652  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.861.244  
 50 Patente de Estados Unidos n.º 5.863.732  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.863.753  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.866.331  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.866.337  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.866.366  
 55 Patente de Estados Unidos n.º 5.900.481  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.905.024  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.910.407  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.912.124  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.912.145  
 60 Patente de Estados Unidos n.º 5.916.776  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.916.779  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.919.626  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.919.630  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.922.574  
 65 Patente de Estados Unidos n.º 5.925.517  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.925.525

- Patente de Estados Unidos n.º 5.928.862  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.928.869  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.928.870  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.928.905  
 5 Patente de Estados Unidos n.º 5.928.906  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.929.227  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.932.413  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.932.451  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.935.791  
 10 Patente de Estados Unidos n.º 5.935.825  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.939.291  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.942.391  
 Patente de Estados Unidos n.º 5.952.174  
 Patente de Estados Unidos n.º 6.113.940  
 15 Patente de Estados Unidos n.º 4.656.127  
 Patente de Estados Unidos n.º 4.682.195
- Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, 1989.  
 Barany *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 189-193, 1991.  
 20 Bellus, *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.*, A31 (1): 1355-1376, 1994.  
 Burt *et al.*, *Hypertension*, 25: 305-313, 1995.  
 Campia *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 40: 754-760, 2002.  
 de Arruda *et al.*, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2 (5): 487-496, 2002.  
 Erbs *et al.*, *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.*, 13: 826-831, 2006.  
 25 Patente Europea 201.184  
 Patente Europea 237.362  
 Patente Europea 258.017  
 Patente Europea 266.032  
 Patente Europea 320 308  
 30 Patente Europea 329.822  
 Solicitud de Patente Europea 50.424  
 Solicitud de Patente Europea 84.796  
 Patente Francesa 2.650.840  
 Froehler *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 14: 5399-5407, 1986.  
 35 Frohman, En: *PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications*, Academic Press, N.Y., 1990.  
 Solicitud del Reino Unido 2 202 328  
 Halushka *et al.*, *Nat. Genet.*, 22 (3): 239-247, 1999.  
 Harrison, *J. Clin. Invest.*, 100: 2153-2157, 1997.  
 Humphries *et al.*, En: *Molecular Diagnosis of Genetic Diseases*, Elies (Ed.), 321-340, 1996.  
 40 Ignarro *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 9265-9269, 1987.  
 Imamura *et al.*, *Can. J. Cardiol.*, 20: 1229-1234, 2004.  
 Inazuka *et al.*, *Genome Res*, 7 (11): 1094-1103, 1997.  
 Innis *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 (24): 9436-9440, 1988.  
 Johnson *et al.*, *Nat. Genet.*, 29 (2): 233-237, 2001.  
 45 Jones, *Nature*, 199: 280-282, 1963.  
 Kalinowski *et al.*, *Circulation*, 109: 2511 - 2517, 2004.  
 Ke y Cardon *Bioinformatics*, 19 (2): 287-288, 2003.  
 The Pharmacological Basis of Therapeutics de Klaassen  
 Komher, *et al.*, *Nucl. Acids. Res.* 17: 7779-7784, 1989.  
 50 Kuppaswamy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 1143-1147, 1991.  
 Kwok *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 1173, 1989.  
 Kwok y Chen, *Curr Issues Mol. Biol.*, Apr; 5 (2): 43-60, 2003.  
 Kwok *et al.*, *Genomics*, 23 (1): 138-144, 1994.  
 Kwok *et al.*, *Genomics*, 31 (1): 123-6, 1996.  
 55 Kwok, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 2: 235-258, 2001.  
 Landegren *et al.*, *Science* 241: 1077-1080, 1988.  
 Li *et al.*, *Am. J. Hypertens.*, 17: 560-567, 2004.  
 Lu *et al.*, *Biopolymers*, 73: 606-613, 2004.  
 Lvovich y Scheeline, *Anal. Chem.*, 69: 454-462, 1997.  
 60 Malinski y Taha, *Nature*, 358: 676-678, 1992.  
 Mason *et al.*, *Circulation*, 112: 3795-3801, 2005.  
 Maxam *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 560, 1977.  
 Megson *et al.*, *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 10 (3): 276-85, 2009.  
 Meyers, *et al.*, *Science*, 230: 1242, 1985.  
 65 Modrich, *Ann. Rev. Genet.*, 25: 229-253, 1991.  
 Mullis *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51: 263-273, 1986.

- Münzel *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 95: 187-194, 1995.  
 Napoli *et al.*, *Nitric Oxide*, 15 265-279, 2006.  
 Nickerson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 8923-8927, 1990.  
 Nyren *et al.*, *Anal. Biochem.* 208: 171-175, 1993.  
 5 Ohara *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 5673-5677, 1989.  
 Orita *et al.*, *Genomics*, 5: 874-879, 1989.  
 Paniagua *et al.*, *Circulation*, 103: 1752-1758, 2001..  
 Panza *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 323: 22-27, 1990.  
 Solicitud de PCT PCT/US87/00880  
 10 Solicitud de PCT PCT/US89/01025  
 Solicitud de PCT WO 88/10315  
 Solicitud de PCT WO 89/06700  
 Solicitud de PCT WO 93/22456  
 Solicitud de PCT WO 95/11995  
 15 Solicitud de PCT WO89/06700  
 Solicitud de PCT WO90/01069  
 Solicitud de PCT WO91/02087  
 Solicitud de PCT WO92/15712  
 Physicians Desk Reference  
 20 Prezant *et al.*, *Hum. Mutat.*, 1: 159-164, 1992.  
 Rees *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 3375-3378, 1989.  
 Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580, 1990.  
 Ruano *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 19: 6877-6882, 1991.  
 Ruano *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 17: 8392, 1989.  
 25 Sambrook *et al.*, En: *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.  
 Sanger *et al.*, *J. Molec. Biol.*, 94: 441,1975.  
 Sheffield *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 232-236, 1989.  
 Small *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 347: 1135-1142, 2002.  
 Sokolov, *Nucl. Acids Res.* 18: 3671,1990.  
 30 Stevens *et al.*, *Biotechniques*, 34: 198-203, 2003.  
 Syvanen *et al.*, *Genomics* 8: 684-692, 1990.  
 Syvanen *et al.*, *Genomics* 8: 684-692, 1990.  
 Taddei *et al.*, *Hypertension*, 21: 929-933,1993.  
 Taillon-Miller *et al.*, *Genome Res*, 8 (7): 748-754, 1998.  
 35 The Merck Index, Décimo primera Edición  
 Turki *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 95: 1635-1641, 1995.  
 Ugozzoll *et al.*, *GATA* 9: 107-112, 1992.  
 Walker *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 392-396, 1992.  
 Wartell *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 18:2699-2706, 1990.  
 40 Winter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 7575, 1985.

## LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> BRISTOW, MICHAEL R.  
 45 PORT, J. DAVID  
 <120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA ENFERMEDADES Y AFECCIONES CARDIOVASCULARES  
 <130> ARCA.P0024WO  
 50 <140> DESCONOCIDO  
 <141> 23-12-2010  
 <150> 61/289.932  
 <151> 23-12-2009  
 55 <160> 10  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 60 <210> 1  
 <211> 4345  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 65 <220>  
 <221> CDS

<222> (297)..(3908)

<400> 1

```

actgaaacta ggggcaagga gacgaagaga acatgaaagt taaactttaa gatgaagaac      60
aaagctgaac atactgatgc attggatcct tggagaggat ctcagaactc attgtactta      120
atttacaggc taaaacctta gaagaggaat ttattatata ctacacaaga ctccagggaa      180
gcacatggcc ttggactgaa ggctggcctc tgggaagctgt cagccaccag caccttctgc      240
agcaggaaaa ggccagggct ctgctggagc aggcagcaga gtggacgcan agtaac atg      299
                                         Met
                                         1

ggc aac ttg aag agc gtg gcc cag gag cct ggg cca ccc tgc ggc ctg      347
Gly Asn Leu Lys Ser Val Ala Gln Glu Pro Gly Pro Pro Cys Gly Leu
                    5                                10                    15

ggg ctg ggg ctg ggc ctt ggg ctg tgc ggc aag cag ggc cca gcc acc      395
Gly Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Cys Gly Lys Gln Gly Pro Ala Thr
                    20                                25                    30

ccg gcc cct gag ccc agc cgg gcc cca gca tcc cta ctc cca cca gcg      443
Pro Ala Pro Glu Pro Ser Arg Ala Pro Ala Ser Leu Leu Pro Pro Ala
                    35                                40                    45

cca gaa cac agc ccc ccg agc tcc ccg cta acc cag ccc cca gag ggg      491
Pro Glu His Ser Pro Pro Ser Ser Pro Leu Thr Gln Pro Pro Glu Gly
                    50                                55                    60                    65

ccc aag ttc cct cgt gtg aag aac tgg gag gtg ggg agc atc acc tat      539
Pro Lys Phe Pro Arg Val Lys Asn Trp Glu Val Gly Ser Ile Thr Tyr
                    70                                75                    80

gac acc ctc agc gcc cag gcg cag cag gat ggg ccc tgc acc cca aga      587
Asp Thr Leu Ser Ala Gln Ala Gln Gln Asp Gly Pro Cys Thr Pro Arg

```

5

85					90					95					
cgc tgc ctg ggc tcc ctg gta ttt cca cgg aaa cta cag ggc cgg ccc	Arg Cys Leu Gly Ser Leu Val Phe Pro Arg Lys Leu Gln Gly Arg Pro	100	105	110	635										
tcc ccc ggc ccc ccg gcc cct gag cag ctg ctg agt cag gcc cgg gac	Ser Pro Gly Pro Pro Ala Pro Glu Gln Leu Leu Ser Gln Ala Arg Asp	115	120	125	683										
ttc atc aac cag tac tac agc tcc att aag agg agc ggc tcc cag gcc	Phe Ile Asn Gln Tyr Tyr Ser Ser Ile Lys Arg Ser Gly Ser Gln Ala	130	135	140	731										
cac gaa cag cgg ctt caa gag gtg gaa gcc gag gtg gca gcc aca ggc	His Glu Gln Arg Leu Gln Glu Val Glu Ala Glu Val Ala Ala Thr Gly	150	155	160	779										
acc tac cag ctt agg gag agc gag ctg gtg ttc ggg gct aag cag gcc	Thr Tyr Gln Leu Arg Glu Ser Glu Leu Val Phe Gly Ala Lys Gln Ala	165	170	175	827										
tgg cgc aac gct ccc cgc tgc gtg ggc cgg atc cag tgg ggg aag ctg	Trp Arg Asn Ala Pro Arg Cys Val Gly Arg Ile Gln Trp Gly Lys Leu	180	185	190	875										
cag gtg ttc gat gcc cgg gac tgc agg tct gca cag gaa atg ttc acc	Gln Val Phe Asp Ala Arg Asp Cys Arg Ser Ala Gln Glu Met Phe Thr	195	200	205	923										
tac atc tgc aac cac atc aag tat gcc acc aac cgg ggc aac ctt cgc	Tyr Ile Cys Asn His Ile Lys Tyr Ala Thr Asn Arg Gly Asn Leu Arg	210	215	220	971										
tcg gcc atc aca gtg ttc ccg cag cgc tgc cct ggc cga gga gac ttc	Ser Ala Ile Thr Val Phe Pro Gln Arg Cys Pro Gly Arg Gly Asp Phe	230	235	240	1019										
cga atc tgg aac agc cag ctg gtg cgc tac gcg ggc tac cgg cag cag	Arg Ile Trp Asn Ser Gln Leu Val Arg Tyr Ala Gly Tyr Arg Gln Gln	245	250	255	1067										
gat ggc tct gtg cgg ggg gac cca gcc aac gtg gag atc acc gag ctc	Asp Gly Ser Val Arg Gly Asp Pro Ala Asn Val Glu Ile Thr Glu Leu	260	265	270	1115										
tgc att cag cac ggc tgg acc cca gga aac ggt cgc ttc gac gtg ctg	Cys Ile Gln His Gly Trp Thr Pro Gly Asn Gly Arg Phe Asp Val Leu	275	280	285	1163										
ccc ctg ctg ctg cag gcc cca gat gag ccc cca gaa ctc ttc ctt ctg	Pro Leu Leu Leu Gln Ala Pro Asp Glu Pro Pro Glu Leu Phe Leu Leu	290	295	300	1211										
ccc ccc gag ctg gtc ctt gag gtg ccc ctg gag cac ccc acg ctg gag	Pro Pro Glu Leu Val Leu Glu Val Pro Leu Glu His Pro Thr Leu Glu	310	315	320	1259										
tgg ttt gca gcc ctg ggc ctg cgc tgg tac gcc ctc ccg gca gtg tcc	Trp Phe Ala Ala Leu Gly Leu Arg Trp Tyr Ala Leu Pro Ala Val Ser	325	330	335	1307										
aac atg ctg ctg gaa att ggg ggc ctg gag ttc ccc gca gcc ccc ttc	Asn Met Leu Leu Glu Ile Gly Gly Leu Glu Phe Pro Ala Ala Pro Phe	340	345	350	1355										

agt ggc tgg tac atg agc act gag atc ggc acg agg aac ctg tgt gac	1403
Ser Gly Trp Tyr Met Ser Thr Glu Ile Gly Thr Arg Asn Leu Cys Asp	
355 360 365	
cct cac cgc tac aac atc ctg gag gat gtg gct gtc tgc atg gac ctg	1451
Pro His Arg Tyr Asn Ile Leu Glu Asp Val Ala Val Cys Met Asp Leu	
370 375 380 385	
gat acc cgg acc acc tcg tcc ctg tgg aaa gac aag gca gca gtg gaa	1499
Asp Thr Arg Thr Thr Ser Ser Leu Trp Lys Asp Lys Ala Ala Val Glu	
390 395 400	
atc aac gtg gcc gtg ctg cac agt tac cag cta gcc aaa gtc acc atc	1547
Ile Asn Val Ala Val Leu His Ser Tyr Gln Leu Ala Lys Val Thr Ile	
405 410 415	
gtg gac cac cac gcc gcc acg gcc tct ttc atg aag cac ctg gag aat	1595
Val Asp His His Ala Ala Thr Ala Ser Phe Met Lys His Leu Glu Asn	
420 425 430	
gag cag aag gcc agg ggg ggc tgc cct gca gac tgg gcc tgg atc gtg	1643
Glu Gln Lys Ala Arg Gly Gly Cys Pro Ala Asp Trp Ala Trp Ile Val	
435 440 445	
ccc ccc atc tcg ggc agc ctc act cct gtt ttc cat cag gag atg gtc	1691
Pro Pro Ile Ser Gly Ser Leu Thr Pro Val Phe His Gln Glu Met Val	
450 455 460 465	
aac tat ttc ctg tcc ccg gcc ttc cgc tac cag cca gac ccc tgg aag	1739
Asn Tyr Phe Leu Ser Pro Ala Phe Arg Tyr Gln Pro Asp Pro Trp Lys	
470 475 480	
ggg agt gcc gcc aag ggc acc ggc atc acc agg aag aag acc ttt aaa	1787
Gly Ser Ala Ala Lys Gly Thr Gly Ile Thr Arg Lys Lys Thr Phe Lys	
485 490 495	
gaa gtg gcc aac gcc gtg aag atc tcc gcc tcg ctc atg ggc acg gtg	1835
Glu Val Ala Asn Ala Val Lys Ile Ser Ala Ser Leu Met Gly Thr Val	
500 505 510	
atg gcg aag cga gtg aag gcg aca atc ctg tat ggc tcc gag acc ggc	1883
Met Ala Lys Arg Val Lys Ala Thr Ile Leu Tyr Gly Ser Glu Thr Gly	
515 520 525	
cgg gcc cag agc tac gca cag cag ctg ggg aga ctc ttc cgg aag gct	1931
Arg Ala Gln Ser Tyr Ala Gln Gln Leu Gly Arg Leu Phe Arg Lys Ala	
530 535 540 545	
ttt gat ccc cgg gtc ctg tgt atg gat gag tat gac gtg gtg tcc ctc	1979
Phe Asp Pro Arg Val Leu Cys Met Asp Glu Tyr Asp Val Val Ser Leu	
550 555 560	
gaa cac gag acg ctg gtg ctg gtg gta acc agc aca ttt ggg aat ggg	2027
Glu His Glu Thr Leu Val Leu Val Val Thr Ser Thr Phe Gly Asn Gly	
565 570 575	
gat ccc ccg gag aat gga gag agc ttt gca gct gcc ctg atg gag atg	2075
Asp Pro Pro Glu Asn Gly Glu Ser Phe Ala Ala Ala Leu Met Glu Met	
580 585 590	
tcc ggc ccc tac aac agc tcc cct cgg ccg gaa cag cac aag agt tat	2123
Ser Gly Pro Tyr Asn Ser Ser Pro Arg Pro Glu Gln His Lys Ser Tyr	
595 600 605	

aag atc cgc ttc aac agc atc tcc tgc tca gac cca ctg gtg tcc tct Lys Ile Arg Phe Asn Ser Ile Ser Cys Ser Asp Pro Leu Val Ser Ser 610 615 620 625	2171
tgg cgg cgg aag agg aag gag tcc agt aac aca gac agt gca ggg gcc Trp Arg Arg Lys Arg Lys Glu Ser Ser Asn Thr Asp Ser Ala Gly Ala 630 635 640	2219
ctg ggc acc ctc agg ttc tgt gtg ttc ggg ctc ggc tcc cgg gca tac Leu Gly Thr Leu Arg Phe Cys Val Phe Gly Leu Gly Ser Arg Ala Tyr 645 650 655	2267
ccc cac ttc tgc gcc ttt gct cgt gcc gtg gac aca cgg ctg gag gaa Pro His Phe Cys Ala Phe Ala Arg Ala Val Asp Thr Arg Leu Glu Glu 660 665 670	2315
ctg ggc ggg gag cgg ctg ctg cag ctg ggc cag ggc gac gag ctg tgc Leu Gly Gly Glu Arg Leu Leu Gln Leu Gly Gln Gly Asp Glu Leu Cys 675 680 685	2363
ggc cag gag gag gcc ttc cga ggc tgg gcc cag gct gcc ttc cag gcc Gly Gln Glu Glu Ala Phe Arg Gly Trp Ala Gln Ala Ala Phe Gln Ala 690 695 700 705	2411
gcc tgt gag acc ttc tgt gtg gga gag gat gcc aag gcc gcc gcc cga Ala Cys Glu Thr Phe Cys Val Gly Glu Asp Ala Lys Ala Ala Ala Arg 710 715 720	2459
gac atc ttc agc ccc aaa cgg agc tgg aag cgc cag agg tac cgg ctg Asp Ile Phe Ser Pro Lys Arg Ser Trp Lys Arg Gln Arg Tyr Arg Leu 725 730 735	2507
agc gcc cag gcc gag ggc ctg cag ttg ctg cca ggt ctg atc cac gtg Ser Ala Gln Ala Glu Gly Leu Gln Leu Leu Pro Gly Leu Ile His Val 740 745 750	2555
cac agg cgg aag atg ttc cag gct aca atc cgc tca gtg gaa aac ctg His Arg Arg Lys Met Phe Gln Ala Thr Ile Arg Ser Val Glu Asn Leu 755 760 765	2603
caa agc agc aag tcc acg agg gcc acc atc ctg gtg cgc ctg gac acc Gln Ser Ser Lys Ser Thr Arg Ala Thr Ile Leu Val Arg Leu Asp Thr 770 775 780 785	2651
gga ggc cag gag ggg ctg cag tac cag ccg ggg gac cac ata ggt gtc Gly Gly Gln Glu Gly Leu Gln Tyr Gln Pro Gly Asp His Ile Gly Val 790 795 800	2699
tgc ccg ccc aac cgg ccc ggc ctt gtg gag gcg ctg ctg agc cgc gtg Cys Pro Pro Asn Arg Pro Gly Leu Val Glu Ala Leu Leu Ser Arg Val 805 810 815	2747
gag gac ccg ccg gcg ccc act gag ccc gtg gca gta gag cag ctg gag Glu Asp Pro Pro Ala Pro Thr Glu Pro Val Ala Val Glu Gln Leu Glu 820 825 830	2795
aag ggc agc cct ggt ggc cct ccc ccc ggc tgg gtg cgg gac ccc cgg Lys Gly Ser Pro Gly Gly Pro Pro Pro Gly Trp Val Arg Asp Pro Arg 835 840 845	2843
ctg ccc ccg tgc acg ctg cgc cag gct ctc acc ttc ttc ctg gac atc Leu Pro Pro Cys Thr Leu Arg Gln Ala Leu Thr Phe Phe Leu Asp Ile 850 855 860 865	2891
acc tcc cca ccc agc cct cag ctc ttg cgg ctg ctc agc acc ttg gca	2939

Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Arg	Leu	Leu	Ser	Thr	Leu	Ala		
				870					875					880			
gaa	gag	ccc	agg	gaa	cag	cag	gag	ctg	gag	gcc	ctc	agc	cag	gat	ccc		2987
Glu	Glu	Pro	Arg	Glu	Gln	Gln	Glu	Leu	Glu	Ala	Leu	Ser	Gln	Asp	Pro		
			885					890					895				
cga	cgc	tac	gag	gag	tgg	aag	tgg	ttc	cgc	tgc	ccc	acg	ctg	ctg	gag		3035
Arg	Arg	Tyr	Glu	Glu	Trp	Lys	Trp	Phe	Arg	Cys	Pro	Thr	Leu	Leu	Glu		
		900					905					910					
gtg	ctg	gag	cag	ttc	ccg	tcg	gtg	ggc	ctg	cct	gcc	cca	ctg	ctc	ctc		3083
Val	Leu	Glu	Gln	Phe	Pro	Ser	Val	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Leu	Leu	Leu		
	915					920					925						
acc	cag	ctg	cct	ctg	ctc	cag	ccc	cgg	tac	tac	tca	gtc	agc	tgc	gca		3131
Thr	Gln	Leu	Pro	Leu	Leu	Gln	Pro	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Val	Ser	Ser	Ala		
	930				935				940						945		
ccc	agc	acc	cac	cca	gga	gag	atc	cac	ctc	act	gta	gct	gtg	ctg	gca		3179
Pro	Ser	Thr	His	Pro	Gly	Glu	Ile	His	Leu	Thr	Val	Ala	Val	Leu	Ala		
			950					955						960			
tac	agg	act	cag	gat	ggg	ctg	ggc	ccc	ctg	cac	tat	gga	gtc	tgc	tcc		3227
Tyr	Arg	Thr	Gln	Asp	Gly	Leu	Gly	Pro	Leu	His	Tyr	Gly	Val	Cys	Ser		
			965				970						975				
acg	tgg	cta	agc	cag	ctc	aag	ccc	gga	gac	cct	gtg	ccc	tgc	ttc	atc		3275
Thr	Trp	Leu	Ser	Gln	Leu	Lys	Pro	Gly	Asp	Pro	Val	Pro	Cys	Phe	Ile		
		980				985					990						
cgg	ggg	gct	ccc	tcc	ttc	cgg	ctg	cca	ccc	gat	ccc	agc	ttg	ccc	tgc		3323
Arg	Gly	Ala	Pro	Ser	Phe	Arg	Leu	Pro	Pro	Asp	Pro	Ser	Leu	Pro	Cys		
	995					1000				1005							
atc	ctg	gtg	ggt	cca	ggc	act	ggc	att	gcc	ccc	ttc	cgg	gga	ttc			3368
Ile	Leu	Val	Gly	Pro	Gly	Thr	Gly	Ile	Ala	Pro	Phe	Arg	Gly	Phe			
	1010				1015				1020								
tgg	cag	gag	cgg	ctg	cat	gac	att	gag	agc	aaa	ggg	ctg	cag	ccc			3413
Trp	Gln	Glu	Arg	Leu	His	Asp	Ile	Glu	Ser	Lys	Gly	Leu	Gln	Pro			
	1025				1030				1035								
act	ccc	atg	act	ttg	gtg	ttc	ggc	tgc	cga	tgc	tcc	caa	ctt	gac			3458
Thr	Pro	Met	Thr	Leu	Val	Phe	Gly	Cys	Arg	Cys	Ser	Gln	Leu	Asp			
	1040				1045				1050								
cat	ctc	tac	cgc	gac	gag	gtg	cag	aac	gcc	cag	cag	cgc	ggg	gtg			3503
His	Leu	Tyr	Arg	Asp	Glu	Val	Gln	Asn	Ala	Gln	Gln	Arg	Gly	Val			
	1055				1060				1065								
ttt	ggc	cga	gtc	ctc	acc	gcc	ttc	tcc	cgg	gaa	cct	gac	aac	ccc			3548
Phe	Gly	Arg	Val	Leu	Thr	Ala	Phe	Ser	Arg	Glu	Pro	Asp	Asn	Pro			
	1070				1075				1080								
aag	acc	tac	gtg	cag	gac	atc	ctg	agg	acg	gag	ctg	gct	ggc	gag			3593
Lys	Thr	Tyr	Val	Gln	Asp	Ile	Leu	Arg	Thr	Glu	Leu	Ala	Ala	Glu			
	1085				1090				1095								
gtg	cac	cgc	gtg	ctg	tgc	ctc	gag	cgg	ggc	dac	atg	ttt	gtc	tgc			3638
Val	His	Arg	Val	Leu	Cys	Leu	Glu	Arg	Gly	His	Met	Phe	Val	Cys			
	1100				1105				1110								
ggc	gat	ggt	acc	atg	gca	acc	aac	gtc	ctg	cag	acc	gtg	cag	cgc			3683
Gly	Asp	Val	Thr	Met	Ala	Thr	Asn	Val	Leu	Gln	Thr	Val	Gln	Arg			



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

Ser Asn Met Leu Leu Glu Ile Gly Gly Leu Glu Phe Pro Ala Ala Pro  
 340 345 350

Phe Ser Gly Trp Tyr Met Ser Thr Glu Ile Gly Thr Arg Asn Leu Cys  
 355 360 365

Asp Pro His Arg Tyr Asn Ile Leu Glu Asp Val Ala Val Cys Met Asp  
 370 375 380

Leu Asp Thr Arg Thr Thr Ser Ser Leu Trp Lys Asp Lys Ala Ala Val  
 385 390 395 400

Glu Ile Asn Val Ala Val Leu His Ser Tyr Gln Leu Ala Lys Val Thr  
 405 410 415

Ile Val Asp His His Ala Ala Thr Ala Ser Phe Met Lys His Leu Glu  
 420 425 430

Asn Glu Gln Lys Ala Arg Gly Gly Cys Pro Ala Asp Trp Ala Trp Ile  
 435 440 445

Val Pro Pro Ile Ser Gly Ser Leu Thr Pro Val Phe His Gln Glu Met  
 450 455 460

Val Asn Tyr Phe Leu Ser Pro Ala Phe Arg Tyr Gln Pro Asp Pro Trp  
 465 470 475 480

Lys Gly Ser Ala Ala Lys Gly Thr Gly Ile Thr Arg Lys Lys Thr Phe  
 485 490 495

Lys Glu Val Ala Asn Ala Val Lys Ile Ser Ala Ser Leu Met Gly Thr  
 500 505 510

Val Met Ala Lys Arg Val Lys Ala Thr Ile Leu Tyr Gly Ser Glu Thr  
 515 520 525

Gly Arg Ala Gln Ser Tyr Ala Gln Gln Leu Gly Arg Leu Phe Arg Lys  
 530 535 540

Ala Phe Asp Pro Arg Val Leu Cys Met Asp Glu Tyr Asp Val Val Ser  
 545 550 555 560

Leu Glu His Glu Thr Leu Val Leu Val Val Thr Ser Thr Phe Gly Asn  
 565 570 575

Gly Asp Pro Pro Glu Asn Gly Glu Ser Phe Ala Ala Ala Leu Met Glu  
 580 585 590

Met Ser Gly Pro Tyr Asn Ser Ser Pro Arg Pro Glu Gln His Lys Ser

	595					600						605					
Tyr	Lys	Ile	Arg	Phe	Asn	Ser	Ile	Ser	Cys	Ser	Asp	Pro	Leu	Val	Ser		
	610					615					620						
Ser	Trp	Arg	Arg	Lys	Arg	Lys	Glu	Ser	Ser	Asn	Thr	Asp	Ser	Ala	Gly		
	625				630					635					640		
Ala	Leu	Gly	Thr	Leu	Arg	Phe	Cys	Val	Phe	Gly	Leu	Gly	Ser	Arg	Ala		
				645					650					655			
Tyr	Pro	His	Phe	Cys	Ala	Phe	Ala	Arg	Ala	Val	Asp	Thr	Arg	Leu	Glu		
			660					665					670				
Glu	Leu	Gly	Gly	Glu	Arg	Leu	Leu	Gln	Leu	Gly	Gln	Gly	Asp	Glu	Leu		
		675					680					685					
Cys	Gly	Gln	Glu	Glu	Ala	Phe	Arg	Gly	Trp	Ala	Gln	Ala	Ala	Phe	Gln		
	690					695					700						
Ala	Ala	Cys	Glu	Thr	Phe	Cys	Val	Gly	Glu	Asp	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala		
	705				710					715						720	
Arg	Asp	Ile	Phe	Ser	Pro	Lys	Arg	Ser	Trp	Lys	Arg	Gln	Arg	Tyr	Arg		
				725					730					735			
Leu	Ser	Ala	Gln	Ala	Glu	Gly	Leu	Gln	Leu	Leu	Pro	Gly	Leu	Ile	His		
			740					745					750				
Val	His	Arg	Arg	Lys	Met	Phe	Gln	Ala	Thr	Ile	Arg	Ser	Val	Glu	Asn		
		755					760					765					
Leu	Gln	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Ile	Leu	Val	Arg	Leu	Asp		
	770					775					780						
Thr	Gly	Gly	Gln	Glu	Gly	Leu	Gln	Tyr	Gln	Pro	Gly	Asp	His	Ile	Gly		
	785				790				795						800		
Val	Cys	Pro	Pro	Asn	Arg	Pro	Gly	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Leu	Ser	Arg		
				805					810					815			
Val	Glu	Asp	Pro	Pro	Ala	Pro	Thr	Glu	Pro	Val	Ala	Val	Glu	Gln	Leu		
			820					825					830				
Glu	Lys	Gly	Ser	Pro	Gly	Gly	Pro	Pro	Pro	Gly	Trp	Val	Arg	Asp	Pro		
		835					840					845					
Arg	Leu	Pro	Pro	Cys	Thr	Leu	Arg	Gln	Ala	Leu	Thr	Phe	Phe	Leu	Asp		
	850					855					860						

Ile Thr Ser Pro Pro Ser Pro Gln Leu Leu Arg Leu Leu Ser Thr Leu  
865 870 875 880

Ala Glu Glu Pro Arg Glu Gln Gln Glu Leu Glu Ala Leu Ser Gln Asp  
885 890 895

Pro Arg Arg Tyr Glu Glu Trp Lys Trp Phe Arg Cys Pro Thr Leu Leu  
900 905 910

Glu Val Leu Glu Gln Phe Pro Ser Val Ala Leu Pro Ala Pro Leu Leu  
915 920 925

Leu Thr Gln Leu Pro Leu Leu Gln Pro Arg Tyr Tyr Ser Val Ser Ser  
930 935 940

Ala Pro Ser Thr His Pro Gly Glu Ile His Leu Thr Val Ala Val Leu  
945 950 955 960

Ala Tyr Arg Thr Gln Asp Gly Leu Gly Pro Leu His Tyr Gly Val Cys  
965 970 975

Ser Thr Trp Leu Ser Gln Leu Lys Pro Gly Asp Pro Val Pro Cys Phe  
980 985 990

Ile Arg Gly Ala Pro Ser Phe Arg Leu Pro Pro Asp Pro Ser Leu Pro  
995 1000 1005

Cys Ile Leu Val Gly Pro Gly Thr Gly Ile Ala Pro Phe Arg Gly  
1010 1015 1020

Phe Trp Gln Glu Arg Leu His Asp Ile Glu Ser Lys Gly Leu Gln  
1025 1030 1035

Pro Thr Pro Met Thr Leu Val Phe Gly Cys Arg Cys Ser Gln Leu  
1040 1045 1050

Asp His Leu Tyr Arg Asp Glu Val Gln Asn Ala Gln Gln Arg Gly  
1055 1060 1065

Val Phe Gly Arg Val Leu Thr Ala Phe Ser Arg Glu Pro Asp Asn  
1070 1075 1080

Pro Lys Thr Tyr Val Gln Asp Ile Leu Arg Thr Glu Leu Ala Ala  
1085 1090 1095

Glu Val His Arg Val Leu Cys Leu Glu Arg Gly His Met Phe Val  
1100 1105 1110

Cys Gly Asp Val Thr Met Ala Thr Asn Val Leu Gln Thr Val Gln  
 1115 1120 1125

Arg Ile Leu Ala Thr Glu Gly Asp Met Glu Leu Asp Glu Ala Gly  
 1130 1135 1140

Asp Val Ile Gly Val Leu Arg Asp Gln Gln Arg Tyr His Glu Asp  
 1145 1150 1155

Ile Phe Gly Leu Thr Leu Arg Thr Gln Glu Val Thr Ser Arg Ile  
 1160 1165 1170

Arg Thr Gln Ser Phe Ser Leu Gln Glu Arg Gln Leu Arg Gly Ala  
 1175 1180 1185

Val Pro Trp Ala Phe Asp Pro Pro Gly Ser Asp Thr Asn Ser Pro  
 1190 1195 1200

<210> 3  
 <211> 4345  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (297)..(3908)

10

<400> 3

actgaaacta ggggcaagga gacgaagaga acatgaaagt taaacttta gatgaagaac 60  
 aaagctgaac atactgatgc attggatctt tggagaggat ctccagaactc attgtactta 120  
 atttacaggc taaaacctta gaagaggaat ttattatata ctacacaaga ctccagggaa 180  
 gcacatggcc ttggactgaa ggctggcctc tgggaagctgt cagccaccag caccttctgc 240  
 agcaggaaaa ggccagggct ctgctggagc aggcagcaga gtggagcac agtaac atg 299  
 Met  
 1

ggc aac ttg aag agc gtg gcc cag gag cct ggg cca ccc tgc ggc ctg 347  
 Gly Asn Leu Lys Ser Val Ala Gln Glu Pro Gly Pro Pro Cys Gly Leu  
 5 10 15

ggg ctg ggg ctg ggc ctt ggg ctg tgc ggc aag cag ggc cca gcc acc 395  
 Gly Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Cys Gly Lys Gln Gly Pro Ala Thr  
 20 25 30

ccg gcc cct gag ccc agc cgg gcc cca gca tcc cta ctc cca cca gcg 443  
 Pro Ala Pro Glu Pro Ser Arg Ala Pro Ala Ser Leu Leu Pro Pro Ala  
 35 40 45

cca gaa cac agc ccc ccg agc tcc ccg cta acc cag ccc cca gag ggg 491  
 Pro Glu His Ser Pro Pro Ser Ser Pro Leu Thr Gln Pro Pro Glu Gly  
 50 55 60 65

ccc aag ttc cct cgt gtg aag aac tgg gag gtg ggg agc atc acc tat 539

Pro	Lys	Phe	Pro	Arg	Val	Lys	Asn	Trp	Glu	Val	Gly	Ser	Ile	Thr	Tyr		
				70					75					80			
gac	acc	ctc	agc	gcc	cag	gcg	cag	cag	gat	ggg	ccc	tgc	acc	cca	aga		587
Asp	Thr	Leu	Ser	Ala	Gln	Ala	Gln	Gln	Asp	Gly	Pro	Cys	Thr	Pro	Arg		
			85					90					95				
cgc	tgc	ctg	ggc	tcc	ctg	gta	ttt	cca	cgg	aaa	cta	cag	ggc	cgg	ccc		635
Arg	Cys	Leu	Gly	Ser	Leu	Val	Phe	Pro	Arg	Lys	Leu	Gln	Gly	Arg	Pro		
		100					105					110					
tcc	ccc	ggc	ccc	ccg	gcc	cct	gag	cag	ctg	ctg	agt	cag	gcc	cgg	gac		683
Ser	Pro	Gly	Pro	Pro	Ala	Pro	Glu	Gln	Leu	Leu	Ser	Gln	Ala	Arg	Asp		
	115					120					125						
ttc	atc	aac	cag	tac	tac	agc	tcc	att	aag	agg	agc	ggc	tcc	cag	gcc		731
Phe	Ile	Asn	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Ile	Lys	Arg	Ser	Gly	Ser	Gln	Ala		
130					135				140					145			
cac	gaa	cag	cgg	ctt	caa	gag	gtg	gaa	gcc	gag	gtg	gca	gcc	aca	ggc		779
His	Glu	Gln	Arg	Leu	Gln	Glu	Val	Glu	Ala	Glu	Val	Ala	Ala	Thr	Gly		
				150				155						160			
acc	tac	cag	ctt	agg	gag	agc	gag	ctg	gtg	ttc	ggg	gct	aag	cag	gcc		827
Thr	Tyr	Gln	Leu	Arg	Glu	Ser	Glu	Leu	Val	Phe	Gly	Ala	Lys	Gln	Ala		
			165					170					175				
tgg	cgc	aac	gct	ccc	cgc	tgc	gtg	ggc	cgg	atc	cag	tgg	ggg	aag	ctg		875
Trp	Arg	Asn	Ala	Pro	Arg	Cys	Val	Gly	Arg	Ile	Gln	Trp	Gly	Lys	Leu		
		180					185					190					
cag	gtg	ttc	gat	gcc	cgg	gac	tgc	agg	tct	gca	cag	gaa	atg	ttc	acc		923
Gln	Val	Phe	Asp	Ala	Arg	Asp	Cys	Arg	Ser	Ala	Gln	Glu	Met	Phe	Thr		
	195					200					205						
tac	atc	tgc	aac	cac	atc	aag	tat	gcc	acc	aac	cgg	ggc	aac	ctt	cgc		971
Tyr	Ile	Cys	Asn	His	Ile	Lys	Tyr	Ala	Thr	Asn	Arg	Gly	Asn	Leu	Arg		
210					215					220				225			
tcg	gcc	atc	aca	gtg	ttc	ccg	cag	cgc	tgc	cct	ggc	cga	gga	gac	ttc		1019
Ser	Ala	Ile	Thr	Val	Phe	Pro	Gln	Arg	Cys	Pro	Gly	Arg	Gly	Asp	Phe		
				230					235					240			
cga	atc	tgg	aac	agc	cag	ctg	gtg	cgc	tac	gcg	ggc	tac	cgg	cag	cag		1067
Arg	Ile	Trp	Asn	Ser	Gln	Leu	Val	Arg	Tyr	Ala	Gly	Tyr	Arg	Gln	Gln		
			245					250					255				
gat	ggc	tct	gtg	cgg	ggg	gac	cca	gcc	aac	gtg	gag	atc	acc	gag	ctc		1115
Asp	Gly	Ser	Val	Arg	Gly	Asp	Pro	Ala	Asn	Val	Glu	Ile	Thr	Glu	Leu		
		260				265						270					
tgc	att	cag	cac	ggc	tgg	acc	cca	gga	aac	ggt	cgc	ttc	gac	gtg	ctg		1163
Cys	Ile	Gln	His	Gly	Trp	Thr	Pro	Gly	Asn	Gly	Arg	Phe	Asp	Val	Leu		
	275					280					285						
ccc	ctg	ctg	ctg	cag	gcc	cca	gat	gat	ccc	cca	gaa	ctc	ttc	ctt	ctg		1211
Pro	Leu	Leu	Leu	Gln	Ala	Pro	Asp	Asp	Pro	Pro	Glu	Leu	Phe	Leu	Leu		
290					295					300				305			
ccc	ccc	gag	ctg	gtc	ctt	gag	gtg	ccc	ctg	gag	cac	ccc	acg	ctg	gag		1259
Pro	Pro	Glu	Leu	Val	Leu	Glu	Val	Pro	Leu	Glu	His	Pro	Thr	Leu	Glu		
				310					315					320			
tgg	ttt	gca	gcc	ctg	ggc	ctg	cgc	tgg	tac	gcc	ctc	ccg	gca	gtg	tcc		1307
Trp	Phe	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu	Arg	Trp	Tyr	Ala	Leu	Pro	Ala	Val	Ser		



tcc ggc ccc tac aac agc tcc cct cgg ccg gaa cag cac aag agt tat	2123
Ser Gly Pro Tyr Asn Ser Ser Pro Arg Pro Glu Gln His Lys Ser Tyr	
595 600 605	
aag atc cgc ttc aac agc atc tcc tgc tca gac cca ctg gtg tcc tct	2171
Lys Ile Arg Phe Asn Ser Ile Ser Cys Ser Asp Pro Leu Val Ser Ser	
610 615 620 625	
tgg cgg cgg aag agg aag gag tcc agt aac aca gac agt gca ggg gcc	2219
Trp Arg Arg Lys Arg Lys Glu Ser Ser Asn Thr Asp Ser Ala Gly Ala	
630 635 640	
ctg ggc acc ctc agg ttc tgt gtg ttc ggg ctc ggc tcc cgg gca tac	2267
Leu Gly Thr Leu Arg Phe Cys Val Phe Gly Leu Gly Ser Arg Ala Tyr	
645 650 655	
ccc cac ttc tgc gcc ttt gct cgt gcc gtg gac aca cgg ctg gag gaa	2315
Pro His Phe Cys Ala Phe Ala Arg Ala Val Asp Thr Arg Leu Glu Glu	
660 665 670	
ctg ggc ggg gag cgg ctg ctg cag ctg ggc cag ggc gac gag ctg tgc	2363
Leu Gly Gly Glu Arg Leu Leu Gln Leu Gly Gln Gly Asp Glu Leu Cys	
675 680 685	
ggc cag gag gag gcc ttc cga ggc tgg gcc cag gct gcc ttc cag gcc	2411
Gly Gln Glu Glu Ala Phe Arg Gly Trp Ala Gln Ala Ala Phe Gln Ala	
690 695 700 705	
gcc tgt gag acc ttc tgt gtg gga gag gat gcc aag gcc gcc gcc cga	2459
Ala Cys Glu Thr Phe Cys Val Gly Glu Asp Ala Lys Ala Ala Ala Arg	
710 715 720	
gac atc ttc agc ccc aaa cgg agc tgg aag cgc cag agg tac cgg ctg	2507
Asp Ile Phe Ser Pro Lys Arg Ser Trp Lys Arg Gln Arg Tyr Arg Leu	
725 730 735	
agc gcc cag gcc gag ggc ctg cag ttg ctg cca ggt ctg atc cac gtg	2555
Ser Ala Gln Ala Glu Gly Leu Gln Leu Leu Pro Gly Leu Ile His Val	
740 745 750	
cac agg cgg aag atg ttc cag gct aca atc cgc tca gtg gaa aac ctg	2603
His Arg Arg Lys Met Phe Gln Ala Thr Ile Arg Ser Val Glu Asn Leu	
755 760 765	
caa agc agc aag tcc acg agg gcc acc atc ctg gtg cgc ctg gac acc	2651
Gln Ser Ser Lys Ser Thr Arg Ala Thr Ile Leu Val Arg Leu Asp Thr	
770 775 780 785	
gga ggc cag gag ggg ctg cag tac cag ccg ggg gac cac ata ggt gtc	2699
Gly Gly Gln Glu Gly Leu Gln Tyr Gln Pro Gly Asp His Ile Gly Val	
790 795 800	
tgc ccg ccc aac cgg ccc ggc ctt gtg gag gcg ctg ctg agc cgc gtg	2747
Cys Pro Pro Asn Arg Pro Gly Leu Val Glu Ala Leu Leu Ser Arg Val	
805 810 815	
gag gac ccg ccg gcg ccc act gag ccc gtg gca gta gag cag ctg gag	2795
Glu Asp Pro Pro Ala Pro Thr Glu Pro Val Ala Val Glu Gln Leu Glu	
820 825 830	
aag ggc agc cct ggt ggc cct ccc ccc ggc tgg gtg cgg gac ccc cgg	2843
Lys Gly Ser Pro Gly Gly Pro Pro Pro Gly Trp Val Arg Asp Pro Arg	
835 840 845	

ctg ccc ccg tgc acg ctg cgc cag gct ctc acc ttc ttc ctg gac atc Leu Pro Pro Cys Thr Leu Arg Gln Ala Leu Thr Phe Phe Leu Asp Ile 850 855 860 865	2891
acc tcc cca ccc agc cct cag ctc ttg cgg ctg ctc agc acc ttg gca Thr Ser Pro Pro Ser Pro Gln Leu Leu Arg Leu Leu Ser Thr Leu Ala 870 875 880	2939
gaa gag ccc agg gaa cag cag gag ctg gag gcc ctc agc cag gat ccc Glu Glu Pro Arg Glu Gln Gln Glu Leu Glu Ala Leu Ser Gln Asp Pro 885 890 895	2987
cga cgc tac gag gag tgg aag tgg ttc cgc tgc ccc acg ctg ctg gag Arg Arg Tyr Glu Glu Trp Lys Trp Phe Arg Cys Pro Thr Leu Leu Glu 900 905 910	3035
gtg ctg gag cag ttc ccg tgg gtg gcg ctg cct gcc cca ctg ctc ctc Val Leu Glu Gln Phe Pro Ser Val Ala Leu Pro Ala Pro Leu Leu Leu 915 920 925	3083
acc cag ctg cct ctg ctc cag ccc cgg tac tac tca gtc agc tgg gca Thr Gln Leu Pro Leu Leu Gln Pro Arg Tyr Tyr Ser Val Ser Ser Ala 930 935 940 945	3131
ccc agc acc cac cca gga gag atc cac ctc act gta gct gtg ctg gca Pro Ser Thr His Pro Gly Glu Ile His Leu Thr Val Ala Val Leu Ala 950 955 960	3179
tac agg act cag gat ggg ctg ggc ccc ctg cac tat gga gtc tgc tcc Tyr Arg Thr Gln Asp Gly Leu Gly Pro Leu His Tyr Gly Val Cys Ser 965 970 975	3227
acg tgg cta agc cag ctc aag ccc gga gac cct gtg ccc tgc ttc atc Thr Trp Leu Ser Gln Leu Lys Pro Gly Asp Pro Val Pro Cys Phe Ile 980 985 990	3275
cgg ggg gct ccc tcc ttc cgg ctg cca ccc gat ccc agc ttg ccc tgc Arg Gly Ala Pro Ser Phe Arg Leu Pro Pro Asp Pro Ser Leu Pro Cys 995 1000 1005	3323
atc ctg gtg ggt cca ggc act ggc att gcc ccc ttc cgg gga ttc Ile Leu Val Gly Pro Gly Thr Gly Ile Ala Pro Phe Arg Gly Phe 1010 1015 1020	3368
tgg cag gag cgg ctg cat gac att gag agc aaa ggg ctg cag ccc Trp Gln Glu Arg Leu His Asp Ile Glu Ser Lys Gly Leu Gln Pro 1025 1030 1035	3413
act ccc atg act ttg gtg ttc ggc tgc cga tgc tcc caa ctt gac Thr Pro Met Thr Leu Val Phe Gly Cys Arg Cys Ser Gln Leu Asp 1040 1045 1050	3458
cat ctc tac cgc gac gag gtg cag aac gcc cag cag cgc ggg gtg His Leu Tyr Arg Asp Glu Val Gln Asn Ala Gln Gln Arg Gly Val 1055 1060 1065	3503
ttt ggc cga gtc ctc acc gcc ttc tcc cgg gaa cct gac aac ccc Phe Gly Arg Val Leu Thr Ala Phe Ser Arg Glu Pro Asp Asn Pro 1070 1075 1080	3548
aag acc tac gtg cag gac atc ctg agg acg gag ctg gct gcg gag Lys Thr Tyr Val Gln Asp Ile Leu Arg Thr Glu Leu Ala Ala Glu 1085 1090 1095	3593
gtg cac cgc gtg ctg tgc ctc gag cgg ggc cac atg ttt gtc tgc	3638

Val	His	Arg	Val	Leu	Cys	Leu	Glu	Arg	Gly	His	Met	Phe	Val	Cys		
1100					1105					1110						
ggc	gat	gtt	acc	atg	gca	acc	aac	gtc	ctg	cag	acc	gtg	cag	cgc		3683
Gly	Asp	Val	Thr	Met	Ala	Thr	Asn	Val	Leu	Gln	Thr	Val	Gln	Arg		
1115					1120					1125						
atc	ctg	gcg	acg	gag	ggc	gac	atg	gag	ctg	gac	gag	gcc	ggc	gac		3728
Ile	Leu	Ala	Thr	Glu	Gly	Asp	Met	Glu	Leu	Asp	Glu	Ala	Gly	Asp		
1130					1135					1140						
gtc	atc	ggc	gtg	ctg	cgg	gat	cag	caa	cgc	tac	cac	gaa	gac	att		3773
Val	Ile	Gly	Val	Leu	Arg	Asp	Gln	Gln	Arg	Tyr	His	Glu	Asp	Ile		
1145					1150					1155						
ttc	ggg	ctc	acg	ctg	cgc	acc	cag	gag	gtg	aca	agc	cgc	ata	cgc		3818
Phe	Gly	Leu	Thr	Leu	Arg	Thr	Gln	Glu	Val	Thr	Ser	Arg	Ile	Arg		
1160					1165					1170						
acc	cag	agc	ttt	tcc	ttg	cag	gag	cgt	cag	ttg	cgg	ggc	gca	gtg		3863
Thr	Gln	Ser	Phe	Ser	Leu	Gln	Glu	Arg	Gln	Leu	Arg	Gly	Ala	Val		
1175					1180					1185						
ccc	tgg	gcg	ttc	gac	cct	ccc	ggc	tca	gac	acc	aac	agc	ccc	tga		3908
Pro	Trp	Ala	Phe	Asp	Pro	Pro	Gly	Ser	Asp	Thr	Asn	Ser	Pro			
1190					1195					1200						
gagccgcctg gctttccctt ccagttccgg gagagcggct gcccgactca ggtcgcgccg																
accaggatca gcccgcctcc tcccctcttg aggtggtgcc ttctcacatc tgtccagagg																
ctgcaaggat tcagcattat toctccagga aggagcaaaa cgctctttt ccctctctag																
gcctgttgcc tcgggcctgg gtccgcctta atctggaagg cccctcccag cagcgggtacc																
ccagggccta ctgccaccog cttcctgttt cttagtcgaa tgtagattc ctcttgctc																
tctcaggagt atcttacctg taaagtctaa tctctaaatc aagtatttat tattgaagat																
ttaccataag ggactgtgcc agatgttagg agaactacta aagtgcctac cccagctcat																
gtggattaca aaaaaaa																

<210> 4  
 <211> 1203  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 4

Met	Gly	Asn	Leu	Lys	Ser	Val	Ala	Gln	Glu	Pro	Gly	Pro	Pro	Cys	Gly
1				5					10					15	
Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Cys	Gly	Lys	Gln	Gly	Pro	Ala
			20					25					30		
Thr	Pro	Ala	Pro	Glu	Pro	Ser	Arg	Ala	Pro	Ala	Ser	Leu	Leu	Pro	Pro
		35					40					45			
Ala	Pro	Glu	His	Ser	Pro	Pro	Ser	Ser	Pro	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Glu
		50					55					60			

5

10

Gly Pro Lys Phe Pro Arg Val Lys Asn Trp Glu Val Gly Ser Ile Thr  
 65 70 75 80

Tyr Asp Thr Leu Ser Ala Gln Ala Gln Gln Asp Gly Pro Cys Thr Pro  
 85 90 95

Arg Arg Cys Leu Gly Ser Leu Val Phe Pro Arg Lys Leu Gln Gly Arg  
 100 105 110

Pro Ser Pro Gly Pro Pro Ala Pro Glu Gln Leu Leu Ser Gln Ala Arg  
 115 120 125

Asp Phe Ile Asn Gln Tyr Tyr Ser Ser Ile Lys Arg Ser Gly Ser Gln  
 130 135 140

Ala His Glu Gln Arg Leu Gln Glu Val Glu Ala Glu Val Ala Ala Thr  
 145 150 155 160

Gly Thr Tyr Gln Leu Arg Glu Ser Glu Leu Val Phe Gly Ala Lys Gln  
 165 170 175

Ala Trp Arg Asn Ala Pro Arg Cys Val Gly Arg Ile Gln Trp Gly Lys  
 180 185 190

Leu Gln Val Phe Asp Ala Arg Asp Cys Arg Ser Ala Gln Glu Met Phe  
 195 200 205

Thr Tyr Ile Cys Asn His Ile Lys Tyr Ala Thr Asn Arg Gly Asn Leu  
 210 215 220

Arg Ser Ala Ile Thr Val Phe Pro Gln Arg Cys Pro Gly Arg Gly Asp  
 225 230 235 240

Phe Arg Ile Trp Asn Ser Gln Leu Val Arg Tyr Ala Gly Tyr Arg Gln  
 245 250 255

Gln Asp Gly Ser Val Arg Gly Asp Pro Ala Asn Val Glu Ile Thr Glu  
 260 265 270

Leu Cys Ile Gln His Gly Trp Thr Pro Gly Asn Gly Arg Phe Asp Val  
 275 280 285

Leu Pro Leu Leu Leu Gln Ala Pro Asp Asp Pro Pro Glu Leu Phe Leu  
 290 295 300

Leu Pro Pro Glu Leu Val Leu Glu Val Pro Leu Glu His Pro Thr Leu  
 305 310 315 320

Glu Trp Phe Ala Ala Leu Gly Leu Arg Trp Tyr Ala Leu Pro Ala Val  
 325 330 335  
 Ser Asn Met Leu Leu Glu Ile Gly Gly Leu Glu Phe Pro Ala Ala Pro  
 340 345 350  
 Phe Ser Gly Trp Tyr Met Ser Thr Glu Ile Gly Thr Arg Asn Leu Cys  
 355 360 365  
 Asp Pro His Arg Tyr Asn Ile Leu Glu Asp Val Ala Val Cys Met Asp  
 370 375 380  
 Leu Asp Thr Arg Thr Thr Ser Ser Leu Trp Lys Asp Lys Ala Ala Val  
 385 390 395 400  
 Glu Ile Asn Val Ala Val Leu His Ser Tyr Gln Leu Ala Lys Val Thr  
 405 410 415  
 Ile Val Asp His His Ala Ala Thr Ala Ser Phe Met Lys His Leu Glu  
 420 425 430  
 Asn Glu Gln Lys Ala Arg Gly Gly Cys Pro Ala Asp Trp Ala Trp Ile  
 435 440 445  
 Val Pro Pro Ile Ser Gly Ser Leu Thr Pro Val Phe His Gln Glu Met  
 450 455 460  
 Val Asn Tyr Phe Leu Ser Pro Ala Phe Arg Tyr Gln Pro Asp Pro Trp  
 465 470 475 480  
 Lys Gly Ser Ala Ala Lys Gly Thr Gly Ile Thr Arg Lys Lys Thr Phe  
 485 490 495  
 Lys Glu Val Ala Asn Ala Val Lys Ile Ser Ala Ser Leu Met Gly Thr  
 500 505 510  
 Val Met Ala Lys Arg Val Lys Ala Thr Ile Leu Tyr Gly Ser Glu Thr  
 515 520 525  
 Gly Arg Ala Gln Ser Tyr Ala Gln Gln Leu Gly Arg Leu Phe Arg Lys  
 530 535 540  
 Ala Phe Asp Pro Arg Val Leu Cys Met Asp Glu Tyr Asp Val Val Ser  
 545 550 555 560  
 Leu Glu His Glu Thr Leu Val Leu Val Val Thr Ser Thr Phe Gly Asn  
 565 570 575

Gly Asp Pro Pro Glu Asn Gly Glu Ser Phe Ala Ala Ala Leu Met Glu  
 580 585 590  
 Met Ser Gly Pro Tyr Asn Ser Ser Pro Arg Pro Glu Gln His Lys Ser  
 595 600 605  
 Tyr Lys Ile Arg Phe Asn Ser Ile Ser Cys Ser Asp Pro Leu Val Ser  
 610 615 620  
 Ser Trp Arg Arg Lys Arg Lys Glu Ser Ser Asn Thr Asp Ser Ala Gly  
 625 630 635 640  
 Ala Leu Gly Thr Leu Arg Phe Cys Val Phe Gly Leu Gly Ser Arg Ala  
 645 650 655  
 Tyr Pro His Phe Cys Ala Phe Ala Arg Ala Val Asp Thr Arg Leu Glu  
 660 665 670  
 Glu Leu Gly Gly Glu Arg Leu Leu Gln Leu Gly Gln Gly Asp Glu Leu  
 675 680 685  
 Cys Gly Gln Glu Glu Ala Phe Arg Gly Trp Ala Gln Ala Ala Phe Gln  
 690 695 700  
 Ala Ala Cys Glu Thr Phe Cys Val Gly Glu Asp Ala Lys Ala Ala Ala  
 705 710 715 720  
 Arg Asp Ile Phe Ser Pro Lys Arg Ser Trp Lys Arg Gln Arg Tyr Arg  
 725 730 735  
 Leu Ser Ala Gln Ala Glu Gly Leu Gln Leu Leu Pro Gly Leu Ile His  
 740 745 750  
 Val His Arg Arg Lys Met Phe Gln Ala Thr Ile Arg Ser Val Glu Asn  
 755 760 765  
 Leu Gln Ser Ser Lys Ser Thr Arg Ala Thr Ile Leu Val Arg Leu Asp  
 770 775 780  
 Thr Gly Gly Gln Glu Gly Leu Gln Tyr Gln Pro Gly Asp His Ile Gly  
 785 790 795 800  
 Val Cys Pro Pro Asn Arg Pro Gly Leu Val Glu Ala Leu Leu Ser Arg  
 805 810 815  
 Val Glu Asp Pro Pro Ala Pro Thr Glu Pro Val Ala Val Glu Gln Leu  
 820 825 830  
 Glu Lys Gly Ser Pro Gly Gly Pro Pro Pro Gly Trp Val Arg Asp Pro



Glu Val His Arg Val Leu Cys Leu Glu Arg Gly His Met Phe Val  
 1100 1105 1110  
 Cys Gly Asp Val Thr Met Ala Thr Asn Val Leu Gln Thr Val Gln  
 1115 1120 1125  
 Arg Ile Leu Ala Thr Glu Gly Asp Met Glu Leu Asp Glu Ala Gly  
 1130 1135 1140  
 Asp Val Ile Gly Val Leu Arg Asp Gln Gln Arg Tyr His Glu Asp  
 1145 1150 1155  
 Ile Phe Gly Leu Thr Leu Arg Thr Gln Glu Val Thr Ser Arg Ile  
 1160 1165 1170  
 Arg Thr Gln Ser Phe Ser Leu Gln Glu Arg Gln Leu Arg Gly Ala  
 1175 1180 1185  
 Val Pro Trp Ala Phe Asp Pro Pro Gly Ser Asp Thr Asn Ser Pro  
 1190 1195 1200

5 <210> 5  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 10 <400> 5  
 aaggcaggag acagtggatg ga 22  
 <210> 6  
 15 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> Cebador sintético  
 <400> 6  
 cccagtcaat cccttggatg ctca 24  
 25 <210> 7  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Cebador sintético  
 <400> 7  
 35 tggagagtgc tgggtaccc ca 22  
 <210> 8  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40

ES 2 587 191 T3

	<220>	
	<223> Cebador sintético	
5	<400> 8 gcctccaccc ccaccctgtc	20
	<210> 9	
	<211> 21	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético	
15	<400> 9 aggccctatg gtagtcctt t	21
	<210> 10	
20	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador sintético	
	<400> 10 tctcttagtg ctgtgtcac	20

## REIVINDICACIONES

- 5 1. El compuesto S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección cardiovascular, en el que una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto se administra al paciente después de haber sometido a ensayo al paciente y determinar que es homocigoto de tipo silvestre (G/G) en la posición 894 en el gen de la óxido nítrico sintasa (NOS3) endotelial.
- 10 2. Uso del compuesto S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato para la preparación de una composición farmacéutica para tratar una enfermedad o afección cardiovascular, en el que una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto se administra al paciente después de haber sometido a ensayo al paciente y determinar que es homocigoto de tipo silvestre (G/G) en la posición 894 en el gen de la óxido nítrico sintasa (NOS3) endotelial.
- 15 3. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en los que la enfermedad o afección cardiovascular es enfermedad arterial periférica, insuficiencia cardiaca, enfermedad cardiaca coronaria, espasmo coronario, infarto de miocardio, aterosclerosis o hipertensión arterial pulmonar.
- 20 4. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 3 o el uso de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en el que al menos una dosis de la composición se va a administrar al paciente, en el que la composición comprende aproximadamente 1-40 mg del compuesto, o en el que la composición comprende aproximadamente 5-20 mg del compuesto.
- 25 5. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 4 o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que múltiples dosis de la composición se van a administrar al paciente.
- 30 6. El compuesto para su uso o el uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que múltiples dosis de la composición en un periodo de 24 horas o en el que 1 a 3 dosis de la composición, en el que la composición comprende aproximadamente 1-40 mg del compuesto, se van a administrar al paciente.
- 35 7. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el paciente se ha sometido a ensayo para determinar el genotipo del paciente en la posición 894 en el gen de NOS3 después de haber proporcionado o suministrado una muestra biológica del paciente.
- 40 8. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el genotipo del paciente en la posición 894 en el gen de NOS3 se ha determinado después de haber pedido un ensayo.
- 45 9. S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato para su uso en el tratamiento de un paciente que se ha diagnosticado con una enfermedad o afección asociada con la producción de NO, en el que dicha enfermedad es un trastorno cardiovascular isquémico, glaucoma o un trastorno intestinal, en el que una cantidad eficaz de S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato se administra al paciente después de haber sometido a ensayo al paciente y determinar que es homocigoto de tipo silvestre (G/G) en la posición 894 en el gen de la óxido nítrico sintasa (NOS3) endotelial.
- 50 10. Uso de S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato para la preparación de una composición farmacéutica para tratar a un paciente que se ha diagnosticado con una enfermedad o afección asociada con la producción de NO, en el que dicha enfermedad es un trastorno cardiovascular isquémico, glaucoma o un trastorno intestinal, en el que una cantidad eficaz de S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato se administra al paciente después de haber sometido a ensayo al paciente y determinar que es homocigoto de tipo silvestre (G/G) en la posición 894 en el gen de la óxido nítrico sintasa (NOS3) endotelial.
- 55 11. S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato para su uso en el aumento de los niveles de óxido nítrico (NO) en un paciente que se ha diagnosticado con una enfermedad o afección asociada con la producción de NO, en el que dicha enfermedad es un trastorno cardiovascular isquémico, glaucoma o un trastorno intestinal, en el que una cantidad eficaz de dicho S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato se administra al paciente después de haber sometido a ensayo al paciente y determinar que es homocigoto de tipo silvestre (G/G) en la posición 894 en el gen de la óxido nítrico sintasa (NOS3) endotelial.
- 60 12. Uso de S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato para la preparación de una composición farmacéutica para aumentar los niveles de óxido nítrico (NO) en un paciente que se ha diagnosticado con una enfermedad o afección asociada con la producción de NO, en el que dicha enfermedad es un trastorno cardiovascular isquémico, glaucoma o un trastorno intestinal, en el que una cantidad eficaz de dicho S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato se administra al paciente después de haber sometido a ensayo al paciente y determinar que es homocigoto de tipo silvestre (G/G) en la posición 894 en el gen de la óxido nítrico sintasa (NOS3) endotelial.
- 65

- 5 13. Un método *in vitro* para identificar un paciente adecuado para tratamiento con S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato que comprende determinar si el paciente es homocigoto de tipo silvestre (G/G) en la posición 894 en el gen de la óxido nítrico sintasa (NOS3) endotelial, en el que el paciente es adecuado para tratamiento con S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato si el paciente es homocigoto de tipo silvestre (G/G) en la posición 894 en el gen de NOS3.
- 10 14. Un método para diagnosticar un paciente como un candidato adecuado para tratamiento con S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato que comprende someter a ensayo una muestra del paciente para determinar si el paciente es homocigoto de tipo silvestre (G/G) en la posición 894 en el gen de la óxido nítrico sintasa (NOS3) endotelial e informar si el paciente es homocigoto de tipo silvestre (G/G) en la posición 894 en el gen de NOS3.
- 15 15. Uso de un kit para identificar un paciente adecuado para tratamiento con S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato o para diagnosticar un paciente como un candidato adecuado para tratamiento con S-(6-Nitro-oxi-hexahidro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)tioacetato, en el que dicho kit comprende, en un envase adecuado, una sonda o al menos un conjunto de cebadores para identificar el polimorfismo de NOS3 en la posición 894.
- 20 16. El uso de la reivindicación 15, en la que la sonda comprende al menos un ácido nucleico de entre 15 y 100 nucleótidos de SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 3, en el que la sonda incluye el nucleótido en la posición 894 del gen de NOS3.
- 25 17. El uso de la reivindicación 15, en el que los cebadores comprenden al menos un conjunto de cebadores para amplificar una región de secuencia que incluye la posición 894 del gen de NOS3.

FIG. 1

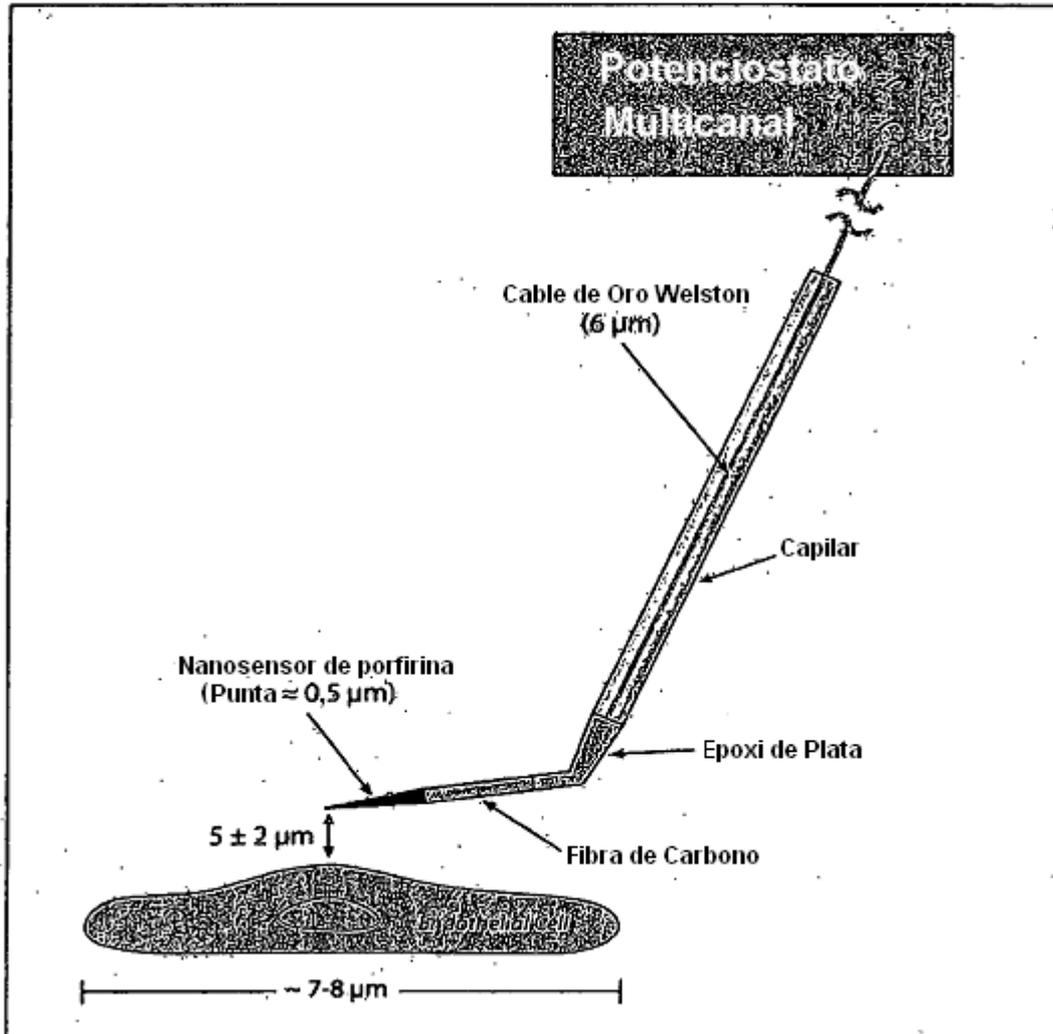
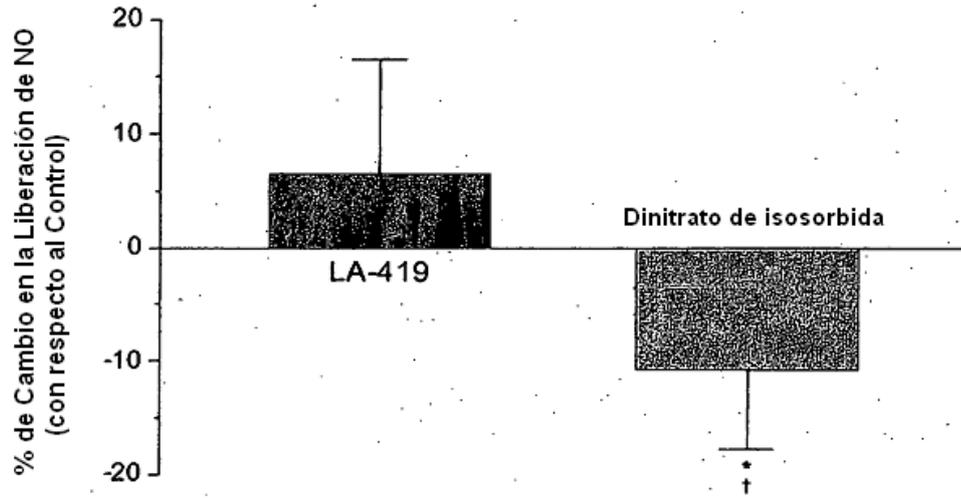


FIG. 2



**FIG. 3**

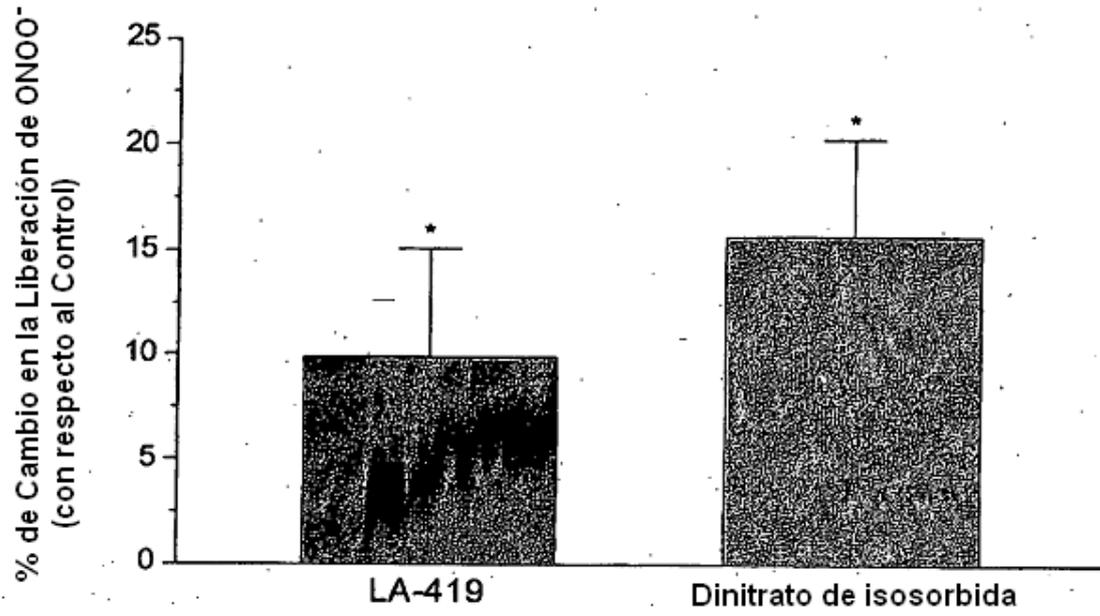


FIG. 4

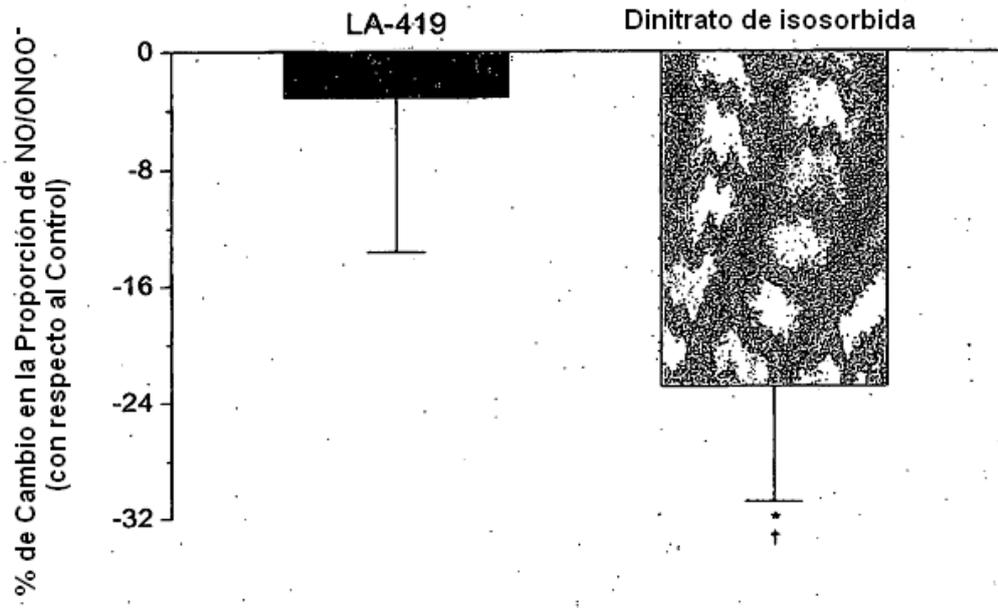
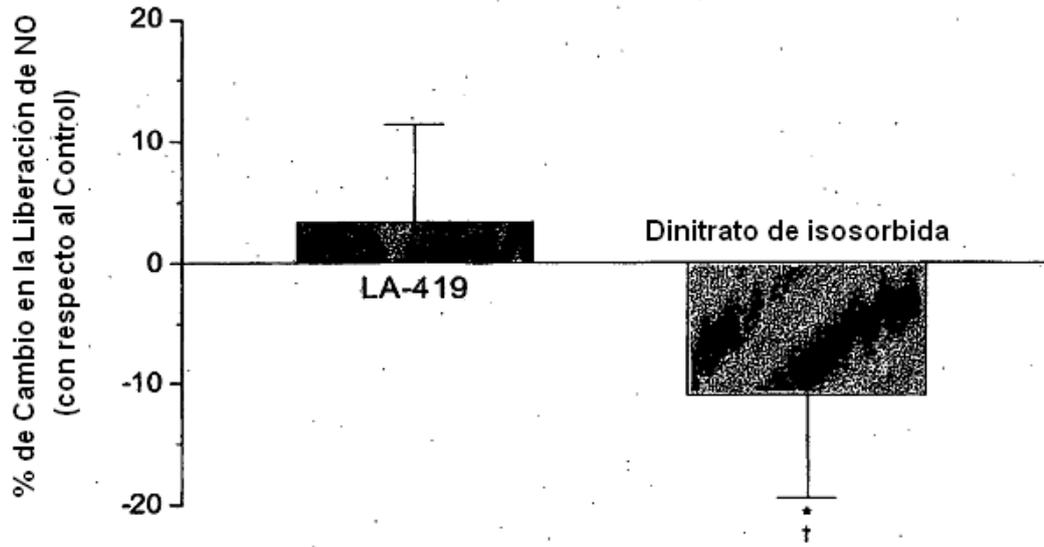


FIG. 5



**FIG. 6**

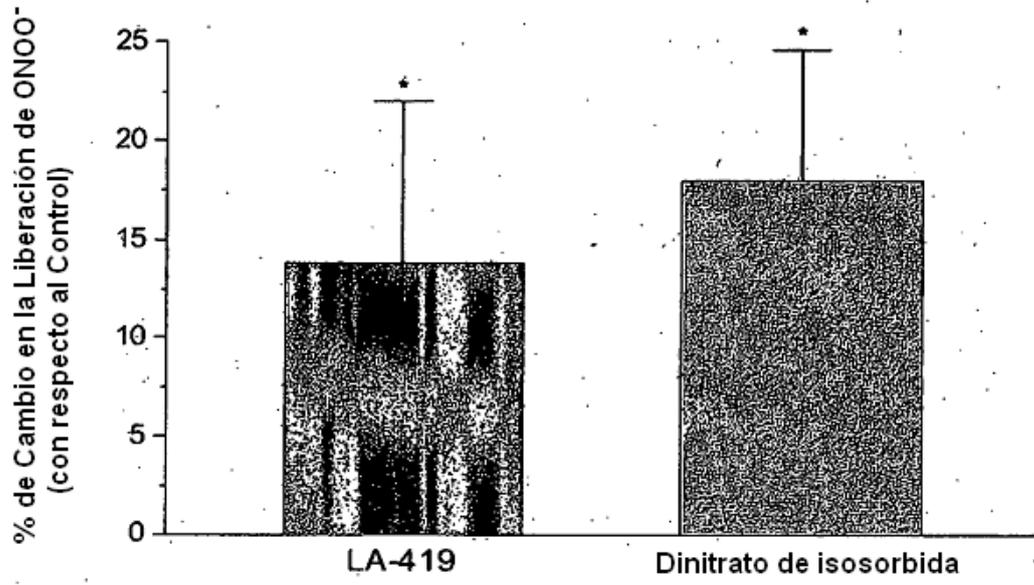


FIG. 7

