

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 697**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C07H 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2003** **E 16158762 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018** **EP 3072978**

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

30 Prioridad:

09.05.2002 US 379173 P

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

10.10.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

LEE, RICHARD T.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 685 697 T3

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

DESCRIPCIÓN

1L1RL-1 como un marcador de enfermedades cardiovasculares

Esta invención se refiere a métodos para la selección del tratamiento de afecciones cardiovasculares, más específicamente, infarto de miocardio e insuficiencia cardíaca.

5 Antecedentes de la invención

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

Resumen de la invención

20 La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas. Se divulgan también métodos y composiciones para el diagnóstico y tratamiento de afecciones cardiovasculares. Más específicamente, se identificó un gen que está regulado positivamente en células cardíacas cuando las células se someten a deformación inducida mecánicamente. A la vista de estos descubrimientos, se cree que las moléculas de la presente divulgación se pueden usar para tratar afecciones cardiovasculares (incluyendo vasculares), que incluyen hipertrofia cardíaca, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, arteriosclerosis e insuficiencia cardíaca.

25 Adicionalmente, también se divulgan métodos para usar estas moléculas en el diagnóstico de cualquiera de las afecciones cardiovasculares (incluidas las vasculares) anteriores. Además, también se divulgan composiciones útiles en la preparación de preparaciones terapéuticas para el tratamiento de las afecciones anteriores. Por lo tanto, la presente divulgación implica, en varios aspectos, polipéptidos, ácidos nucleicos aislados que codifican aquellos polipéptidos, modificaciones funcionales y variantes de los anteriores, fragmentos útiles de los anteriores, así como agentes terapéuticos y diagnósticos relacionados con los mismos.

30 De acuerdo con un aspecto de la divulgación, se proporciona un método para diagnosticar una afección caracterizada por la expresión aberrante de una molécula de ácido nucleico o un producto de expresión de la misma (o de fragmentos únicos de las moléculas anteriores de la misma). El método implica poner en contacto una muestra biológica de un sujeto con un agente, en donde dicho agente se une específicamente a dicha molécula de ácido nucleico, un producto de expresión del mismo, o un fragmento de un producto de expresión del mismo, y midiendo la cantidad de agente unido y determinando desde allí si la expresión de dicha molécula de ácido nucleico o de un producto de expresión de la misma es aberrante, siendo la expresión aberrante diagnóstico del trastorno, en el que la molécula de ácido nucleico es interleucina 1 similar a Receptor 1 (IL1RL-1, también conocida como T1/ST2, ST2, y Fit-1, SEQ ID NOs: 1 y 2 para la forma soluble y SEQ ID NOs: 3 y 4 para la forma de membrana). Los términos IL1RL-1, T1/ST2, ST2 y Fit-1, se usan indistintamente a continuación a lo largo de la especificación. En algunas realizaciones, el trastorno es una afección cardiovascular seleccionada del grupo que consiste en infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, arteriosclerosis e insuficiencia cardíaca. En una realización, el trastorno es hipertrofia cardíaca. En otra realización, el trastorno es insuficiencia cardíaca. En ciertas realizaciones, las muestras biológicas incluyen muestras de biopsia y fluidos biológicos tales como sangre/suero.

45 De acuerdo con otro aspecto más de la divulgación, se proporciona un método para determinar una etapa (por ejemplo, regresión, progresión o inicio) de una afección cardiovascular en un sujeto caracterizado por la expresión aberrante de una molécula de ácido nucleico o un producto de expresión de la misma (o de fragmentos únicos de las moléculas anteriores de los mismos). El método implica monitorizar una muestra de un paciente para un parámetro seleccionado del grupo que consiste en (i) una molécula de ácido nucleico IL1RL-1 (o un fragmento único de la misma), (ii) un polipéptido codificado por el ácido nucleico IL1RL-1, (iii) un péptido derivado del polipéptido (o de un fragmento único del mismo), y (iv) un anticuerpo que se une selectivamente al polipéptido o péptido (o a un fragmento único del mismo), como determinación de una etapa (por ejemplo, regresión, progresión o inicio) de dicha afección cardiovascular en el sujeto. En algunas realizaciones, la muestra es un fluido biológico o un tejido como se describe en cualquiera de las realizaciones anteriores. En ciertas realizaciones, la etapa de monitorización comprende poner en contacto la muestra con un agente detectable seleccionado del grupo que consiste en (a) una molécula de ácido nucleico aislada que hibrida selectivamente en condiciones rigurosas con la molécula de ácido nucleico de (i), (b) un anticuerpo que se une selectivamente al polipéptido de (ii), o el péptido de (iii), y (c) un polipéptido o péptido que se une selectivamente al anticuerpo de (iv). El anticuerpo, polipéptido, péptido o ácido nucleico se puede marcar con un marcador detectable tal

como un marcador radioactivo o una enzima. En realizaciones adicionales, el método comprende monitorizar (ensayar) la muestra para el péptido. En aún otras realizaciones, la monitorización de la muestra ocurre durante un período de tiempo.

5 De acuerdo con otro aspecto de la divulgación, se proporciona un kit. El kit comprende un paquete que contiene un agente que se une selectivamente a cualquiera de los ácidos nucleicos aislados IL1RL-1 anteriores, o productos de expresión de los mismos, y un control para comparar con un valor medido de unión de dicho agente cualquiera de los ácidos nucleicos aislados anteriores o productos de expresión de los mismos. En algunas realizaciones, el control es un valor predeterminado para comparar con el valor medido. En ciertas realizaciones, el control comprende un epítipo del producto de expresión de cualquiera de los ácidos nucleicos aislados anteriores.

10 De acuerdo con un aspecto de la divulgación, se proporciona un método para tratar una afección cardiovascular. El método implica administrar a un sujeto que necesita tal tratamiento una molécula de IL1RL-1, en una cantidad efectiva para tratar la afección cardiovascular. En ciertas realizaciones, la afección cardiovascular se selecciona del grupo que consiste en infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, arteriosclerosis e insuficiencia cardíaca. En algunas realizaciones, el método comprende además la coadministración de un agente seleccionado del grupo que consiste en un agente antiinflamatorio, un agente antitrombótico, un agente antiplaquetario, un agente fibrinolítico, un agente reductor de lípidos, un inhibidor directo de la trombina, un inhibidor del receptor de glucoproteína IIb/IIIa, un agente que se une a moléculas de adhesión celular e inhibe la capacidad de los glóbulos blancos para unirse a dichas moléculas, un bloqueador de canales de calcio, un bloqueador de receptores beta-adrenérgicos, un inhibidor de ciclooxigenasa-2 o un inhibidor del sistema de angiotensina.

20 De acuerdo con otro aspecto de la divulgación, se proporciona un método para tratar la hipertrofia cardíaca. El método implica administrar a un sujeto que necesite dicho tratamiento un agente que aumente la expresión de una molécula de ácido nucleico de IL1RL-1, o un producto de expresión de la misma, en una cantidad efectiva para tratar la hipertrofia cardíaca en el sujeto.

25 De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un método para tratar a un sujeto para reducir el riesgo de una afección cardiovascular que se desarrolla en el sujeto. El método implica administrar a un sujeto que expresa niveles aberrantes de una molécula de IL1RL-1, un agente para reducir el riesgo del trastorno cardiovascular en una cantidad efectiva para reducir el riesgo de que el sujeto desarrolle un futuro trastorno cardiovascular, en el que el agente es un agente antiinflamatorio, un agente antitrombótico, un agente antiplaquetario, un agente fibrinolítico, un agente reductor de lípidos, un inhibidor directo de la trombina, un inhibidor del receptor de la glicoproteína IIb/IIIa, un agente que se une a las moléculas de adhesión celular e inhibe la capacidad de los glóbulos blancos para unirse a tales moléculas, un bloqueador de los canales de calcio, un bloqueador de los receptores beta-adrenérgicos, un inhibidor de la ciclooxigenasa-2 o un inhibidor del sistema de la angiotensina. En ciertas realizaciones, el sujeto está libre de síntomas que requieren tratamiento con el agente.

30 De acuerdo con un aspecto de la divulgación, se proporciona un método para identificar un agente candidato útil en el tratamiento de una afección cardiovascular. El método implica determinar la expresión de la molécula IL1RL-1 en una célula o tejido cardíaco en condiciones que, en ausencia de un agente candidato, permitan una primera cantidad de expresión de la molécula IL1RL-1, poniendo en contacto la célula cardíaca o el tejido con el candidato agente, y detectar una cantidad de prueba de expresión de la molécula de IL1RL-1, en la que una disminución en la cantidad de prueba de expresión en presencia del agente candidato en relación con la primera cantidad de expresión indica que el agente candidato es útil en el tratamiento de la condición cardiovascular. En realizaciones importantes, la molécula de IL1RL-1 es cualquier molécula de SEQ ID NO.:1-4. En ciertas realizaciones, la afección cardiovascular se selecciona del grupo que consiste en hipertrofia cardíaca (por ejemplo, hipertrofia inadaptable), infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, arteriosclerosis e insuficiencia cardíaca.

35 De acuerdo con otro aspecto de la divulgación, se proporciona una composición farmacéutica. La composición comprende un agente que comprende una molécula de ácido nucleico aislada IL1RL-1 (SEQ ID NO: 1 o 3), o un producto de expresión del mismo (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 o 4), en una cantidad farmacéuticamente efectiva para tratar una afección cardiovascular y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la afección cardiovascular se selecciona del grupo que consiste en hipertrofia cardíaca, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, arteriosclerosis e insuficiencia cardíaca.

40 De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, también se proporcionan métodos para preparar medicamentos útiles en el tratamiento de una afección cardiovascular. Los medicamentos contienen preferiblemente una cantidad efectiva de al menos una de las moléculas o composiciones anteriores.

45 De acuerdo con todavía otro aspecto de la divulgación, se proporciona una matriz de moléculas de ácido nucleico en fase sólida. La matriz consiste esencialmente en un conjunto de moléculas de ácido nucleico, productos de expresión de las mismas o fragmentos (del ácido nucleico o la molécula polipeptídica) del mismo, en donde al menos una molécula de IL1RL-1 (incluyendo sus productos de expresión, o fragmentos de los mismos), se fijan a un sustrato sólido. En algunas realizaciones, el conjunto de fase sólida comprende además al menos una molécula de ácido nucleico de control.

En ciertas realizaciones, el sustrato sólido incluye un material seleccionado del grupo que consiste en vidrio, sílica, aluminosilicatos, borosilicatos, óxidos metálicos tales como alúmina y óxido de níquel, diversas arcillas, nitrocelulosa y nailon. Preferiblemente, el sustrato es vidrio. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico se fijan al sustrato sólido por enlace covalente.

5 De acuerdo con otro aspecto de la divulgación, se proporciona un método para evaluar la probabilidad de que un sujeto se beneficie del tratamiento con un agente para reducir el riesgo de una afección cardiovascular. En realizaciones importantes, el agente se selecciona del grupo que consiste en un agente antiinflamatorio, un agente antitrombótico, un agente antiplaquetario, un agente fibrinolítico, un agente reductor de lípidos, un inhibidor de trombina directo, un inhibidor del receptor de glucoproteína IIb/IIIa, un agente que se une a las moléculas de adhesión celular e inhibe la capacidad de los glóbulos blancos para unirse a tales moléculas, un bloqueador de los canales de calcio, un bloqueador de los receptores beta-adrenérgicos, un inhibidor de la ciclooxigenasa-2 y un inhibidor del sistema angiotensina. El método implica obtener un nivel de una molécula de IL1RL-1 en el sujeto y comparar el nivel de la molécula de IL1RL-1 con un valor predeterminado específico para el diagnóstico de una afección cardiovascular. El nivel de la molécula de IL1RL-1 en comparación con el valor predeterminado es indicativo de si el sujeto se beneficiará del tratamiento con dicho agente. En ciertas realizaciones, el valor predeterminado específico para el diagnóstico de una afección cardiovascular es una pluralidad de intervalos de nivel marcador predeterminada y dicha etapa de comparación comprende determinar en cuál de dichos intervalos de nivel del marcador predeterminado, se incluye el nivel de dichos sujetos. La afección cardiovascular puede ser una afección seleccionada del grupo que consiste en hipertrofia cardíaca, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, arteriosclerosis, e insuficiencia cardíaca.

20 En otro aspecto de la divulgación, se proporciona un método para predecir el resultado de una afección cardiovascular. El método implica obtener un nivel de una molécula de IL1RL-1 en el sujeto, y comparar el nivel de la molécula de IL1RL-1 con un valor predeterminado específico para el resultado predicho de una afección cardiovascular. El nivel de la molécula IL1RL-1 en comparación con el valor predeterminado es indicativo de si el sujeto tendrá un resultado bueno/positivo o tendrá un resultado malo/negativo. En algunas realizaciones, un nivel alto de la molécula de IL1RL-1 podría indicar un resultado negativo, mientras que un nivel bajo podría indicar un resultado positivo. En ciertas realizaciones, el valor predeterminado específico para el resultado predicho de una condición cardiovascular es una pluralidad de intervalos de nivel de marcador predeterminados y dicha etapa de comparación comprende determinar en cuál de dichos rangos de nivel de marcador predeterminados cae dicho nivel de sujeto. La condición cardiovascular puede ser una condición seleccionada del grupo que consiste en hipertrofia cardíaca, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, arteriosclerosis e insuficiencia cardíaca.

35 Se puede usar cualquier secuencia de una molécula de IL1RL-1 en cualquiera de los aspectos y realizaciones de la divulgación. Por ejemplo, esto incluye las secuencias de nucleótidos establecidas como SEQ ID Nos.: 5 y 7, además de las secuencias de nucleótidos expuestas como SEQ ID NOs.: 1 y 3. Esto incluye además las secuencias de aminoácidos predichas establecidas como SEQ. ID. NO.: 6 y 8, además de las secuencias de aminoácidos predichas como SEQ ID NOs.: 2 y 4.

Breve descripción de las secuencias

La SEQ ID NO: 1 es la secuencia de nucleótidos del ADNc de IL1RL1 humana (soluble).

La SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos supuesta del producto de traducción del ADNc de la IL1RL1 humano (soluble) (SEQ ID NO: 1).

40 La SEQ ID NO: 3 es la secuencia de nucleótidos del ADNc de IL1RL1 humano (membrana).

La SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos supuesta del producto de traducción de la IL1RL1 humano (membrana) (SEQ ID NO: 3).

La SEQ ID NO: 5 es la secuencia de nucleótidos del ADNc de Fit-1S de rata.

45 La SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos supuesta del producto de traducción de ADNc de Fit-1S de rata (SEQ ID NO: 5).

La SEQ ID NO: 7 es la secuencia de nucleótidos del ADNc de Fit-1M de rata.

La SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos supuesta del producto de traducción de ADNc de Fit-1M de rata (SEQ ID NO: 7).

Breve descripción de los dibujos

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

- La figura 2 representa mediante una transferencia Northern, los efectos de una tensión mecánica cíclica al 8%, el bloqueo del receptor de la angiotensina, angiotensina II, IL-1b, y éster de forbol, sobre la expresión de IL1RL-1 en miocitos cardiacos cultivados a lo largo del tiempo.
- 5 La Figura 3 representa mediante una transferencia Northern, los efectos de una tensión mecánica cíclica al 8%, peróxido de hidrógeno, y TIRON, sobre la expresión de IL1RL-1 en miocitos cardiacos cultivados a lo largo del tiempo.
- La Figura 4 representa mediante una transferencia Northern, los efectos de actinomicina D y ciclohexamida sobre la inducción de la expresión de IL1RL-1 durante una tensión mecánica cíclica al 8% en miocitos cardiacos durante el transcurso de tiempo.
- 10 La Figura 5 representa mediante una transferencia Northern, los efectos de una tensión mecánica cíclica al 8% sola y en combinación con IL-1b, y éster de forbol en ausencia de tensión, sobre la expresión de IL1RL-1 en miocitos cardiacos cultivados a lo largo del tiempo.
- La Figura 6 representa una transferencia Northern de los efectos de una tensión mecánica cíclica al 8% en la expresión de ATPasa vacuolar en miocitos cardiacos cultivados a lo largo del tiempo.
- La Figura 7 representa un kit que incorpora las características de la presente divulgación.
- 15 La Figura 8 representa evolución precoz (a la izquierda) y tardía (a la derecha) de la inducción del ARNm de T2/ST2 mediante tensión mecánica en los miocitos cardíacos. La inducción máxima se produce a las 3 horas, se mantiene durante 9 horas y declina por 15 horas. En los paneles superiores, ARN de T1/ST2; paneles inferiores, bromuro de etidio. Sin ten, sin tensión.
- 20 La Figura 9 representa la inducción de ARNm de T1/ST2 por tensión mecánica (8%), interleucina-1 (10 ng/mL) y éster de forbol (PMA, 200 nM) en 1 y 3 horas. PMA>tensión>IL-1. Panel superior, ARNm de T1/ST2, panel inferior, bromuro de etidio.
- La Figura 10 muestra que T1/ST2 puede ser un gen inducido por la activación de NF-κB durante la señalización del receptor IL-1/IL en miocitos cardiacos. ARNm de T1/ST2 inducido por tensión y por IL-1 en la presencia de la infección con adenovirus de control (izquierda). Con la infección de adenovirus IκB (derecha), que disminuye la actividad de unión a ADN con NF-κB, se bloqueó la inducción de T1/ST2 por IL-1. La inducción de tensión de T1/ST2 fue bloqueada parcialmente por infección por adenovirus IκB sugiriendo otra vía para inducción de T1/ST2 por tensión. Panel superior, ARNm de T1/ST2; panel inferior, bromuro de etidio.
- 25 La figura 11 muestra, la expresión de la proteína T1/ST2 después de infarto de miocardio en ratones mediante inmunohistoquímica en el día 1, pero no 3 días después del infarto. Aumento de 40X.
- 30 La Figura 12 muestra de forma gráfica, los niveles de proteína ST2 en la circulación sistémica de pacientes humanos después de infarto de miocardio; a. proteína ST2 se incrementó significativamente en el día 1 después de infarto de miocardio en comparación con el día 14 y el día 90; b. Análisis de regresión lineal que demuestra una relación positiva significativa ($p < 0.001$) entre la proteína ST₂ circulante y creatina quinasa 1 después de infarto de miocardio. $\text{Log ST}_2 = 0.454(\text{log CK}) - 1.07$; c. Análisis por cuartiles de los niveles de proteína ST2 circulantes el día 1 después de infarto de miocardio y fracción de eyección. La fracción de eyección baja se asocia con niveles elevados de proteína ST2.
- 35 La figura 13 muestra que niveles basales de ST2 elevados eran indicadores de una mayor mortalidad a través de los 30 días de seguimiento (rango logarítmico, $p = 0.0009$).
- Descripción detallada de la invención
- 40 La divulgación implica el descubrimiento de una serie de genes que se regulan positivamente en las células cardíacas cuando las células se someten a una deformación por esfuerzo inducido mecánicamente. En vista de este descubrimiento, se cree que las moléculas de la presente divulgación pueden usarse para tratar condiciones cardiovasculares que incluyen hipertrofia cardíaca, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, arteriosclerosis y/o insuficiencia cardíaca.
- 45 Adicionalmente, también se proporcionan métodos para usar estas moléculas en el diagnóstico de cualquiera de las afecciones cardiovasculares anteriores.
- Adicionalmente, también se proporcionan composiciones útiles en la preparación de preparaciones terapéuticas para el tratamiento de las afecciones anteriores.
- 50 "Regulación positiva", como se usa en este documento, se refiere a aumento de la expresión de un gen y/o de su polipéptido codificado. El "aumento de expresión" se refiere a aumentar (esto es, a un grado detectable) de replicación, transcripción y/o traducción de cualquiera de los ácidos nucleicos de la divulgación (IL1RL-1, SEQ ID Nos.: 1, 3), ya que la regulación positiva de cualquiera de estos procesos da como resultado un aumento de la concentración/cantidad del polipéptido codificado por el gen (ácido nucleico). Por el contrario, "regulación negativa" o "disminución de la expresión"

- como se usa en este documento, se refiere a la disminución de expresión de un gen y/o su polipéptido codificado. La regulación positiva o regulación negativa de la expresión génica se puede determinar directamente mediante la detección de un aumento o disminución, respectivamente, en el nivel de ARNm para el gen, o el nivel de expresión de la proteína del polipéptido codificado por el gen, utilizando cualquier medio apropiado conocido en la técnica, tales como hibridación de ácidos nucleicos o procedimientos de detección de anticuerpos, respectivamente y comparando con controles.
- Una "célula cardíaca", como se usa en este documento, se refiere a un cardiomiocito.
- Una "molécula", como se usa en este documento, abarca tanto "ácidos nucleicos" como "polipéptidos".
- "Expresión", como se usa en este documento, se refiere a la expresión del ácido nucleico y/o polipéptido.
- Como se usa en este documento, un "sujeto" es un mamífero o un mamífero no humano. En todas las realizaciones se prefieren ácidos nucleicos, polipéptidos, y sujetos humanos. Se cree que los resultados obtenidos utilizando las moléculas de humanos y de rata descritos en el presente son predictivos de los resultados que se pueden obtener usando otras secuencias homólogas.
- En general, homólogos y alelos compartirán por lo general al menos una identidad de nucleótidos del 80% y/o al menos una identidad de aminoácidos del 85% con respecto a las secuencias humanas caracterizadas de la divulgación. En otros casos, homólogos y alelos compartirán por lo general al menos una identidad del 90%, 95% o incluso 99% de nucleótidos y/o al menos una identidad del 95%, 98% o incluso 99% de aminoácidos con respecto a las secuencias humanas caracterizadas, respectivamente. La homología puede calcularse usando diversas herramientas informáticas disponibles al público, desarrolladas por NCBI (Bethesda, Maryland). Las herramientas de ejemplo incluyen el algoritmo heurístico de Altschul SF, et al., (J Mol Biol, 1990, 215: 403-410), conocido también como BLAST. Pueden obtenerse alineamientos por parejas y ClustalW (ajuste de matriz BLOSUM30) así como análisis hidropáticos Kyte-Doolittle usando herramientas públicas (EMBL, Heidelberg, Alemania) y comerciales (por ejemplo, el programa informático de análisis de secuencias MacVector de Oxford Molecular Group/Genetics Computer Group, Madison, WI, Accelrys, Inc., San Diego, CA). La divulgación también abarca complementos de Watson-Crick de los ácidos nucleicos anteriores. En la selección de genes relacionados, tales como homólogos y alelos de las secuencias descritas en cualquier parte en este documento, puede realizarse una transferencia de Southern usando condiciones rigurosas, junto con una sonda. La expresión "condiciones rigurosas", como se usa en este documento, se refiere a parámetros con los que la técnica está familiarizada. Con ácidos nucleicos, se dice que las condiciones de hibridación son rigurosas por lo general en condiciones de baja fuerza iónica y con una temperatura exactamente por debajo de la temperatura de fusión (T_f) del complejo híbrido de ADN (por lo general, aproximadamente 3 °C por debajo de la T_f del híbrido). Una mayor rigurosidad constituye una correlación más específica entre la secuencia de la sonda y la diana. Las condiciones rigurosas usadas en la hibridación de ácidos nucleicos se conocen bien en la técnica y pueden encontrarse en las referencias que recopilan dichos procedimientos, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, o Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Un ejemplo de "condiciones muy rigurosas" es la hibridación a 65 °C en 6 x SSC. Otro ejemplo de condiciones muy rigurosas es la hibridación a 65 °C en solución reguladora de hibridación que consiste en 3.5 x SSC, Ficoll al 0.02%, polivinilpirrolidona al 0.02%, Albúmina de Suero Bovino al 0.02%, Na₂HPO₄ 2.5 mM [pH7], SDS al 0.5%, EDTA 2 mM. (SSC es cloruro de sodio 0.015 M/citrato de sodio 0.15 M, pH 7; SDS es dodecil sulfato de sodio; y EDTA es ácido etilendiaminetetraacético). Después de la hibridación, la membrana sobre la cual se transfiere el ADN, se lava 2 x SSC a temperatura ambiente y después 0.1 x SSC/0,1 x SDS a temperaturas de hasta 68 °C. En un ejemplo adicional, una alternativa al uso de una solución de hibridación acuosa es el uso de una solución de hibridación con formamida. Por lo tanto, pueden conseguirse condiciones de hibridación rigurosas usando, por ejemplo, una solución de formamida al 50% y a 42 °C. Existen otras condiciones, reactivos, etc., que se pueden utilizar, y daría lugar a un grado similar de rigurosidad. El experto en el arte estará familiarizado con dichas condiciones, y por lo tanto no se proporcionan en este documento. Sin embargo, se entenderá, que el experto en el arte podrá manejar las condiciones para permitir identificar claramente homólogos y alelos de ácidos nucleicos de IL1RL-1 de la invención. El experto en el arte también está familiarizado con la metodología para la selección de células y bibliotecas para la expresión de dichas moléculas que luego se aíslan de forma rutinaria, seguido de aislamiento de la molécula de ácido nucleico pertinente y secuenciación.
- A partir de los conocimientos del presente documento de clones de ADNc de rata y de seres humanos de longitud completa, pueden aislarse otras secuencias de mamíferos (ratón, bovinos, etc) tales como los ADNc correspondientes a los ácidos nucleicos de rata y de ser humano relacionados, a partir de genotecas de ADNc usando técnicas de hibridación de colonias convencionales o pueden identificarse usando una búsqueda de homología, por ejemplo, en GenBank usando cualquiera de los algoritmos descritos en cualquier parte del presente documento o conocidos en la técnica. Por ejemplo, con las secuencias con los números iniciales GenBank Y07519.1 y D13695.1 para los homólogos IL1RL-1 de ratón, pueden usarse indistintamente con las secuencias de rata homólogas de la invención. Como se usa en el presente documento, con respecto a los ácidos nucleicos, la expresión "aislado" significa: (i) amplificado *in vitro*, por ejemplo, por reacción en cadena de la polimerasa (PCR); (ii) producido de manera recombinante por clonación; (iii) purificado, como por escisión y separación en gel; o (iv) sintetizado, por ejemplo, por síntesis química. Un ácido nucleico aislado es uno que se maneja fácilmente por técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica. Por lo tanto, se considera aislada, una secuencia de nucleótidos contenida en un vector en el que se conocen los sitios de restricción

5' y 3' o para los que se han desvelado las secuencias cebadoras de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) pero no lo es una secuencia de ácidos nucleicos existente en su estado natural en su huésped natural. Un ácido nucleico aislado puede purificarse sustancialmente, pero no necesariamente. Por ejemplo, un ácido nucleico que está aislado dentro de un vector de expresión o de clonación no es puro ya puede comprender solamente un pequeño porcentaje del material en la célula en la cual reside. Sin embargo, como se usa el término en el presente documento, dicho ácido nucleico está aislado porque, mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos habituales en el arte, se maneja fácilmente.

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

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

Como reconocerán los expertos en el arte, el tamaño del fragmento único dependerá de su conservación en el código genético. Por lo tanto, algunas regiones de las SEQ ID NOs: 1 y 3 y complementos necesitarán segmentos más largos para ser únicos mientras que otros necesitarán solamente segmentos cortos, por lo general entre 12 y 32 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 y 32 bases) o más, hasta la longitud completa de cada una de las secuencias reveladas. Como se ha mencionado anteriormente, la presente divulgación pretende abarcar cada uno y todos los fragmentos de cada secuencia, comenzando desde el primer nucleótido, el segundo nucleótido y así sucesivamente, hasta 8 nucleótidos cortos del final y acabar en cualquier lado a partir del nucleótido número 8, 9, 10 y así sucesivamente para cada secuencia, hasta el nucleótido más alejado (siempre que la secuencia sea única como se ha descrito anteriormente). Por ejemplo, será único, prácticamente cualquier segmento de la región de la SEQ ID NO: 1 que comience en el nucleótido 1 y que acabe en el nucleótido 1357 o de la SEQ ID NO: 3 que comience en el nucleótido 1 y acabe en el nucleótido 2058, o sus complementos, es decir 20 o más nucleótidos de longitud. Los expertos en el arte conocerán bien procedimientos para seleccionar dichas secuencias, por lo general en base a la capacidad del fragmento único para distinguir selectivamente la secuencia de interés de otras secuencias en el genoma humano del fragmento con las de las bases de datos conocidas por lo general es todo lo que se necesita, aunque puede realizarse hibridación confirmativa *in vitro* y análisis de secuenciación.

En ciertos aspectos, la divulgación abarca oligonucleótidos antisentido que se unen selectivamente a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido, para disminuir la actividad del polipéptido.

Como se usa en este documento, los términos "moléculas antisentido", "oligonucleótido antisentido" y "antisentido" describen un oligonucleótido que es un oligorribonucleótido, oligodesoxirribonucleótido, oligorribonucleótido modificado, u oligodesoxirribonucleótido modificado que hibrida bajo condiciones fisiológicas con ADN que comprende un gen particular o un transcrito de ARNm de ese gen y, por lo tanto, inhibe la transcripción de ese gen y/o la traducción de ese ARNm. Las moléculas antisentido están diseñadas para interferir con la transcripción o traducción de un gen diana tras la hibridación con el gen diana o transcrito. Los expertos en la técnica reconocerán que la longitud exacta de un oligonucleótido antisentido y su grado de complementariedad con su objetivo dependerán del objetivo específico seleccionado, que incluye la secuencia del objetivo y las bases particulares que comprenden esa secuencia. Se prefiere que un oligonucleótido antisentido se construya y disponga para unirse selectivamente con una diana bajo condiciones fisiológicas, es decir, hibridar sustancialmente más con la secuencia diana que con cualquier otra secuencia en la célula diana bajo condiciones fisiológicas. Basándose en SEQ ID NOs: 1 y 3, o en secuencias genómicas y/o de ADNc alélicas u homólogas, un experto en la técnica puede elegir y sintetizar fácilmente cualquiera de varias moléculas antisentido apropiadas para su uso de acuerdo con la presente divulgación. Con el fin de ser suficientemente selectivos y potentes para la inhibición, tales oligonucleótidos antisentido deberían comprender al menos 10 y, más preferiblemente, al menos 15 bases consecutivas que son complementarias a la diana, aunque en ciertos casos los oligonucleótidos modificados de tan solo 7 bases de longitud tienen se han usado con éxito como oligonucleótidos antisentido Wagner et al., Nat. Med, 1995, 1(11):1116-1118; Nat. Biotech., 1996, 14:840-844). Más preferiblemente, los oligonucleótidos antisentido comprenden una secuencia complementaria de 20-30 bases.

Aunque se pueden elegir oligonucleótidos que son antisentido para cualquier región del gen o transcritos de ARNm, en realizaciones preferidas los oligonucleótidos antisentido corresponden a sitios N-terminal o 5' cadena arriba tales como inicio de la traducción, iniciación de la transcripción o sitios promotores. Además, las regiones 3' no traducidas pueden ser dirigidas por oligonucleótidos antisentido. También se ha usado en la técnica el direccionamiento a sitios de corte y empalme de ARNm, pero puede ser menos preferido si se produce un corte y empalme de ARNm alternativo. Además, el antisentido está dirigido, preferiblemente, a sitios en los que no se espera una estructura secundaria de ARNm (véase, por ejemplo, Sainio et al., Cell Mol. Neurobiol. 14(5):439-457, 1994) y en qué proteínas no se espera que se unan. Finalmente, aunque las SEQ ID NOs: 1 y 3 divulgan secuencias de ADNc, un experto en la técnica puede derivar fácilmente el ADN genómico correspondiente a las secuencias anteriores. Por lo tanto, la presente divulgación también proporciona oligonucleótidos antisentido que son complementarios al ADN genómico correspondiente a las SEQ ID NO: 1 y 3. De forma similar, los ADNc humanos y ADN genómicos alélicos u homólogos se habilitan sin experimentación indebida.

Los oligonucleótidos de la divulgación pueden incluir moléculas de iARN. El uso de la interferencia de ARN o "iARN" implica el uso de ARN de doble cadena (ARNdc) para bloquear la expresión génica (véase, por ejemplo, ui, G, et al, Proc Natl. Acad. Sci U.S.A. 99:5515-5520,2002) Los métodos para aplicar estrategias de iARN en realizaciones de la divulgación serán conocidos por los expertos en la técnica.

En un conjunto de realizaciones, los oligonucleótidos antisentido pueden estar compuestos de desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos "naturales" o cualquier combinación de los mismos. Es decir, el extremo 5' de un nucleótido nativo y el extremo 3' de otro nucleótido nativo pueden estar unidos covalentemente, como en los sistemas naturales, a través de un enlace internucleosídico de fosfodiéster. Estos oligonucleótidos pueden prepararse por métodos reconocidos en la técnica que pueden llevarse a cabo manualmente o mediante un sintetizador automático. También pueden producirse de forma recombinante por vectores.

En realizaciones preferidas, sin embargo, los oligonucleótidos antisentido también pueden incluir oligonucleótidos "modificados". Es decir, los oligonucleótidos se pueden modificar de varias maneras que no evitan que se hibriden con su diana pero que mejoran su estabilidad o dirección o que de otro modo mejoran su eficacia terapéutica.

El término "oligonucleótido modificado" como se usa en el presente documento describe un oligonucleótido en el que (1) al menos dos de sus nucleótidos están elazados covalentemente a través de un enlace internucleosídico sintético (es decir, un enlace distinto de un enlace fosfodiéster entre el extremo 5' de un nucleótido y el extremo 3' de otro nucleótido) y/o (2) un grupo químico no asociado normalmente con ácidos nucleicos se ha unido covalentemente al oligonucleótido. Los enlaces internucleosídicos sintéticos preferidos son fosforotioatos, alquilfosfonatos, fosforoditioatos, ésteres de fosfato, alquilfosfonotioatos, fosforamidatos, carbamatos, carbonatos, triésteres de fosfato, acetamidatos, ésteres de carboximetilo y péptidos.

El término "oligonucleótido modificado" también abarca oligonucleótidos con una base y/o azúcar modificados covalentemente. Por ejemplo, los oligonucleótidos modificados incluyen oligonucleótidos que tienen azúcares de la cadena principal que están unidos covalentemente a grupos orgánicos de bajo peso molecular distintos de un grupo hidroxilo en la posición 3' y distintos de un grupo fosfato en la posición 5'. Por lo tanto, los oligonucleótidos modificados pueden incluir un grupo ribosa 2'-O-alquilada. Además, los oligonucleótidos modificados pueden incluir azúcares tales como arabinosa en lugar de ribosa. La presente divulgación, por lo tanto, contempla preparaciones farmacéuticas que contienen moléculas antisentido modificadas que son complementarias a y que se pueden hibridar con, bajo condiciones fisiológicas, ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos con SEQ ID NO: 2 y/o 4, junto con vehículos farmacéuticamente aceptables.

Los oligonucleótidos antisentido se pueden administrar como parte de una composición farmacéutica. Dicha composición farmacéutica puede incluir los oligonucleótidos antisentido en combinación con cualquier vehículo fisiológicamente y/o farmacéuticamente aceptable estándar que se conozcan en la técnica. Las composiciones deberían ser estériles y contener una cantidad terapéuticamente efectiva de los oligonucleótidos antisentido en una unidad de peso o volumen adecuada para la administración a un paciente. El término "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la efectividad de la actividad biológica de los ingredientes activos. El término "fisiológicamente aceptable" se refiere a un material no tóxico que es compatible con un sistema biológico tal como una célula, cultivo celular, tejido u organismo. Las características del vehículo dependerán de la ruta de administración. Los vehículos fisiológica y farmacéuticamente aceptables incluyen diluyentes, cargas, sales, reguladores, estabilizantes, solubilizantes y otros materiales que son bien conocidos en la técnica.

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

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

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

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

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

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

También se reconocerá que la divulgación abarca el uso de las SEQ ID NOs: 1 y/o 3 descritas anteriormente, los vectores de expresión que contienen la secuencia de ADNc, para transfectar células huéspedes y líneas celulares, siendo estas procariotas (por ejemplo, *Escherichia coli*) o eucariotas (por ejemplo, células CHO, células COS, sistemas de expresión de levaduras y expresión de baculovirus recombinante en células de insectos). Son especialmente útiles las células de mamífero tales como células de ratón, hámster, cerdo, cabra, primate, etc. Estas pueden ser de una amplia diversidad de tipos tisulares e incluyen células primarias y líneas celulares. Los ejemplos específicos incluyen

células dendríticas, células U293, leucocitos de sangre periférica, células madre de la médula ósea y células madre embrionarias.

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

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

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

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

25 También se divulgan variantes de los polipéptidos descritos anteriormente. Como se usa en el presente documento, una "variante" de un polipéptido es un polipéptido que contiene una o más modificaciones con respecto a la secuencia de aminoácidos primaria de un polipéptido natural (por ejemplo, "de tipo silvestre": un polipéptido con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2 y 4). Las modificaciones que crean una variante polipeptídica se realizan por lo general para el ácido nucleico que codifica el polipéptido y pueden incluir deleciones, mutaciones puntuales, truncamientos, sustituciones de aminoácidos y adición de aminoácidos o de residuos no aminoacídicos para: (1) reducir o eliminar una actividad de un polipéptido; (2) potenciar una propiedad de un polipéptido, tal como estabilidad de la proteína en un sistema de expresión o la estabilidad de la unión del ligando a la proteína; (3) proporcionar una nueva actividad o propiedad a un polipéptido, tal como adición de un epítipo antigénico o adición de un resto de detección; o (4) proporcionar unión equivalente o mejor a un receptor polipeptídico o a otra molécula. Como alternativa, pueden realizarse modificaciones directamente en el polipéptido, tales como mediante escisión, adición de una molécula de unión, adición de un resto de detección, tal como biotina, adición de un ácido graso, y similares. Las modificaciones también abarcan proteínas de fusión que comprenden toda o parte de la secuencia de aminoácidos del polipéptido. Un experto en el arte estará familiarizado con procedimientos para predecir el efecto sobre la conformación de proteínas de un cambio en la secuencia de la proteína y puede por lo tanto "diseñar" un polipéptido variante de acuerdo con procedimientos conocidos. Un ejemplo de dicho procedimiento lo describen Dahiyat and Mayo in Science 278:82-87, 1997, mediante el cual las proteínas pueden diseñarse *de novo*. El procedimiento puede aplicarse a una proteína conocida para variar solamente una parte de la secuencia polipeptídica. Aplicando los procedimientos informáticos de Dahiyat and Mayo, pueden proponerse variantes específicas de cualquiera de los polipéptidos anteriores y realizar ensayos para determinar si la variante conserva una conformación deseada.

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

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

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

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

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

La divulgación tiene un número de usos, algunos de los cuales se describen en otra parte del presente documento. Primero, la divulgación permite el aislamiento de polipéptidos. Para obtener moléculas aisladas, pueden utilizarse diversas metodologías bien conocidas por los expertos en el arte. El polipéptido puede purificarse a partir de células que producen el polipéptido de manera natural por medios cromatográficos o por reconocimiento inmunológico. Como alternativa, para ocasionar la producción del polipéptido, en las células puede introducirse un vector de expresión. En otro procedimiento, para ocasionar la producción del polipéptido codificado, pueden microinyectarse transcritos de ARNm o introducirse en las células de otra manera. Para producir polipéptidos, también puede usarse la traducción de ARNm en extractos acelulares, tales como el sistema de lisado de reticulocitos. Los expertos en el arte también pueden seguir fácilmente procedimientos conocidos para aislar polipéptidos. Estos incluyen, pero sin limitación, inmunocromatografía, HPLC, cromatografía por exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de inmunofinidad.

La invención también divulga, en ciertas realizaciones, polipéptidos "negativos dominantes" derivados de polipéptidos. Un polipéptido negativo dominante es una variante inactiva de una proteína que, al interactuar con la maquinaria celular, desplaza una proteína activa de su interacción con la maquinaria celular o compite con la proteína activa, reduciendo así el efecto de la proteína activa. Por ejemplo, un receptor negativo dominante que se une a un ligando pero no transmite una señal en respuesta a la unión del ligando puede reducir el efecto biológico de la expresión del ligando. Del mismo modo, una quinasa catalíticamente inactiva dominante negativa que interacciona normalmente con proteínas diana pero no fosforila las proteínas diana puede reducir la fosforilación de las proteínas diana en respuesta a una señal celular. De forma similar, un factor de transcripción negativo dominante que se une a un sitio promotor en la región de control de un gen pero no aumenta la transcripción génica puede reducir el efecto de un factor de transcripción normal ocupando sitios de unión del promotor sin aumentar la transcripción.

El resultado final de la expresión de un polipéptido negativo dominante en una célula es una reducción en la función de las proteínas activas. Un experto en la técnica puede evaluar el potencial de una variante dominante negativa de una proteína, y usar técnicas de mutagénesis estándar para crear uno o más polipéptidos variantes negativos dominantes. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.580.723 y Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. El experto en la técnica puede entonces probar la población de polipéptidos mutagenizados para la disminución en una actividad seleccionada y/o para la retención de tal actividad. Otros métodos similares para crear y probar variantes negativas dominantes de una proteína serán evidentes para los expertos en la técnica.

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

La divulgación también abarca agentes de unión peptídicos aislados que pueden ser, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos ("polipéptidos de unión"), que tienen la capacidad de unirse selectivamente a cualquiera de los polipéptidos de la divulgación (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 o 4). Los anticuerpos incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales, preparados de acuerdo con metodología convencional.

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

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

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

Por lo tanto, como será evidente para un experto habitual en el arte, la presente divulgación puede proporcionar fragmentos F(ab')₂, Fab, Fv y Fd; anticuerpos quiméricos, en los que las regiones Fc y/o MC y/o RDC1 y/o RDC2 y/o RDC3 de cadena ligera pueden reemplazarse por secuencias homólogas humanas o no humanas; anticuerpos de fragmentos F(ab')₂ quiméricos en los que las regiones MC y/o RDC1 y/o RDC2 y/o RDC3 de cadena ligera se han reemplazado por secuencias homólogas humanas o no humanas; anticuerpos de fragmentos Fab quiméricos en los que las regiones MC y/o RDC1 y/o RDC2 y/o CDR3 de cadena ligera se han reemplazado por secuencias homólogas humanas o no humanas; y anticuerpos de fragmentos Fd quiméricos en los que las regiones MC y/o RDC1 y/o RDC2 se han reemplazado por secuencias homólogas humanas o no humanas.

Por lo tanto, la divulgación implica polipéptidos de numerosos tamaños y tipos que se unen específicamente a polipéptidos de la divulgación (por ejemplo, a la SEQ ID NO: 2, o 4- sus porciones extracelulares) y formar complejos tanto con polipéptidos como con sus socios de unión. Estos polipéptidos también pueden derivar de fuentes distintas de la tecnología de anticuerpos. Por ejemplo, dichos agentes de unión polipeptídicos pueden proporcionarse a partir de bibliotecas de péptidos degenerados que pueden prepararse fácilmente en solución, en forma inmovilizada, como bibliotecas de presentación de péptidos de flagelos bacterianos o como bibliotecas de presentación de fagos. Las bibliotecas combinatoriales también pueden sintetizarse de péptidos que contienen uno o más aminoácidos. Adicionalmente las bibliotecas pueden sintetizarse de unidades estructurales de síntesis peptídicos y no peptídicos.

La divulgación proporciona además métodos eficientes para identificar agentes o compuestos principales para agentes activos a nivel de una función celular dependiente de un polipéptido o fragmento de polipéptido. En particular, tales funciones incluyen la interacción con otros polipéptidos o fragmentos. En general, los métodos de selección implican el ensayo de compuestos que interfieren con la actividad de un polipéptido de la descripción, aunque los compuestos que

mejoran dicha actividad también se pueden ensayar usando los métodos de selección. Tales métodos son adaptables a la selección automatizada de alto rendimiento de compuestos. Las indicaciones diana incluyen procesos celulares modulados por tales polipéptidos, por ejemplo, sobreexpresión en células bajo tensiones mecánicas.

5 Se proporciona una amplia variedad de ensayos para agentes candidatos (farmacológicos), que incluyen ensayos de unión de proteína-ligando marcados in vitro, ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética, inmunoensayos, ensayos basados en células tales como criba de dos o tres híbridos, ensayos de expresión, etc. Los ácidos nucleicos transfectados pueden codificar, por ejemplo, bibliotecas de péptidos combinatorios o bibliotecas de ADNc. Los reactivos convenientes para tales ensayos, por ejemplo, proteínas de fusión GAL4, son conocidos en la técnica. Un ejemplo de
10 ensayo basado en células implica transfectar una célula con un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la divulgación fusionado a un dominio de unión a ADN GAL4 y un ácido nucleico que codifica un gen informador unido operativamente a una región reguladora de expresión génica, tal como uno o más GAL4 sitios de unión. La activación de la transcripción del gen informador se produce cuando el polipéptido de fusión del informador se une a un agente tal que permite la transcripción del gen informador. Los agentes que modulan la función celular mediada por polipéptidos se detectan luego a través de un cambio en la expresión del gen informador. Los métodos para determinar cambios en la
15 expresión de un gen informador son conocidos en la técnica.

Los fragmentos polipeptídicos usados en los métodos, cuando no se producen mediante un ácido nucleico transfectado se añaden a una mezcla de ensayo como un polipéptido aislado. Los polipéptidos preferiblemente se producen de forma recombinante, aunque tales polipéptidos se pueden aislar a partir de extractos biológicos. Los polipéptidos producidos recombinantemente incluyen proteínas quiméricas que comprenden una fusión de una proteína de la divulgación con
20 otro polipéptido, por ejemplo, un polipéptido capaz de proporcionar o potenciar la unión proteína-proteína, unión a ácido nucleico específica de secuencia (tal como GAL4), potenciando la estabilidad del polipéptido de la divulgación bajo condiciones de ensayo, o proporcionar una unidad estructural detectable, tal como proteína fluorescente verde o un epítoto Flag.

25 La mezcla de ensayo está compuesta por una diana de unión intracelular o extracelular natural capaz de interactuar con un polipéptido de la divulgación. Aunque pueden usarse dianas de unión a polipéptidos naturales, con frecuencia se prefiere usar porciones (por ejemplo, péptidos o fragmentos de ácido nucleico) o análogos (es decir, agentes que imitan las propiedades de unión del polipéptido de la diana de unión natural para los fines del ensayo) de la diana de unión a polipéptidos siempre que la porción o análogo proporcione afinidad de unión y aidez al fragmento polipeptídico medible en el ensayo.

30 La mezcla de ensayo también comprende un agente candidato. Típicamente, una pluralidad de mezclas de ensayo se ejecutan en paralelo con diferentes concentraciones de agente para obtener una respuesta diferente a las diversas concentraciones. Típicamente, una de estas concentraciones sirve como un control negativo, es decir, a una concentración cero de agente o a una concentración de agente por debajo de los límites de detección de ensayo. Los agentes candidatos abarcan numerosas clases químicas, aunque típicamente son compuestos orgánicos.
35 Preferiblemente, los agentes candidatos son compuestos orgánicos pequeños, es decir, aquellos que tienen un peso molecular de más de aproximadamente 50 pero menos de aproximadamente 2500, preferiblemente menos de aproximadamente 1000 y, más preferiblemente, menos de aproximadamente 500. Los agentes candidatos comprenden grupos químicos funcionales necesarios para interacciones estructurales con polipéptidos y/o ácidos nucleicos, y típicamente incluyen al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferiblemente al menos dos de los
40 grupos químicos funcionales y más preferiblemente al menos tres de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos pueden comprender carbono cíclico o estructura heterocíclica y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales identificados anteriormente. Los agentes candidatos también pueden ser biomoléculas tales como péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, isoprenoides, purinas, pirimidinas, derivados o análogos estructurales de los anteriores, o sus combinaciones y similares. Cuando el agente es un ácido
45 nucleico, el agente típicamente es una molécula de ADN o ARN, aunque también se contemplan ácidos nucleicos modificados como se define en la presente memoria.

Los agentes candidatos se obtienen a partir de una amplia variedad de fuentes que incluyen bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, están disponibles numerosos medios para la síntesis dirigida y aleatoria de una
50 amplia variedad de compuestos orgánicos y biomoléculas, que incluyen la expresión de oligonucleótidos aleatorizados, bibliotecas combinatorias orgánicas sintéticas, bibliotecas de presentación en fagos de péptidos aleatorios y similares. Alternativamente, las bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales están disponibles o se producen fácilmente. Además, las bibliotecas y compuestos naturales y sintéticamente producidos pueden modificarse a través de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales. Además, los
55 agentes (farmacológicos) conocidos pueden someterse a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias tales como acilación, alquilación, esterificación, amidación, etc. para producir análogos estructurales de los agentes.

Una variedad de otros reactivos también se pueden incluir en la mezcla. Estos incluyen reactivos tales como sales, reguladores, proteínas neutras (por ejemplo, albúmina), detergentes, etc. que pueden usarse para facilitar la unión óptima proteína-proteína y/o proteína-ácido nucleico. Tal reactivo también puede reducir las interacciones no específicas o de fondo de los componentes de la reacción. También pueden usarse otros reactivos que mejoran la eficacia del
60 ensayo, tales como inhibidores de proteasa, inhibidores de nucleasa, agentes antimicrobianos y similares.

La mezcla de los materiales de ensayo anteriores se incuba bajo condiciones en las que, excepto por la presencia del agente candidato, el polipéptido elegido de la divulgación se une específicamente a una diana de unión celular, una porción del mismo o un análogo del mismo. El orden de adición de los componentes, la temperatura de incubación, el tiempo de incubación y otros parámetros del ensayo pueden determinarse fácilmente. Tal experimentación simplemente implica la optimización de los parámetros del ensayo, no la composición fundamental del ensayo. Las temperaturas de incubación típicamente están entre 4°C y 40°C. Los tiempos de incubación preferiblemente se minimizan para facilitar un cribado rápido y de alto rendimiento, y típicamente están entre 0,1 y 10 horas.

Después de la incubación, la presencia o ausencia de unión específica entre el polipéptido y uno o más dianas de unión se detecta mediante cualquier método conveniente disponible para el usuario. Para ensayos de tipo de unión libre de células, a menudo se usa una etapa de separación para separar los componentes unidos de los no unidos. El paso de separación se puede lograr de varias formas. Convenientemente, al menos uno de los componentes está inmovilizado sobre un sustrato sólido, del cual los componentes no unidos se pueden separar fácilmente. El sustrato sólido puede estar hecho de una amplia variedad de materiales y en una amplia variedad de formas, por ejemplo, placa de microtitulación, microperlas, varilla medidora, partícula de resina, etc. El sustrato preferiblemente se elige para maximizar las relaciones señal a ruido, principalmente para minimizar el fondo vinculante, así como para facilitar la separación y el coste.

La separación puede efectuarse, por ejemplo, retirando una perla o varilla medidora de un depósito, vaciando o diluyendo un depósito tal como un pozo de placa de microtitulación, enjuagando una perla, partícula, columna cromatográfica o filtro con una solución de lavado o disolvente. La etapa de separación preferiblemente incluye múltiples enjuagues o lavados. Por ejemplo, cuando el sustrato sólido es una placa de microtitulación, los pozos se pueden lavar varias veces con una solución de lavado, que típicamente incluye aquellos componentes de la mezcla de incubación que no participan en enlaces específicos tales como sales, regulador, detergente, una proteína no específica, etc. Cuando el sustrato sólido es una perla magnética, las perlas pueden lavarse una o más veces con una solución de lavado y aislarse utilizando un imán.

La detección puede efectuarse de cualquier manera conveniente para ensayos basados en células tales como cribados de dos o tres híbridos. La transcripción resultante de un ensayo de transcripción de gen informador de un polipéptido que interacciona con una molécula diana codifica típicamente un producto detectable directa o indirectamente, por ejemplo, actividad de β -galactosidasa, actividad de luciferasa y similares. Para los ensayos de unión libre de células, uno de los componentes habitualmente comprende, o está acoplado a, un marcador detectable. Se puede usar una amplia variedad de marcadores, tales como aquellas que proporcionan detección directa (por ejemplo, radioactividad, luminiscencia, densidad óptica o electrónica, etc.) o detección indirecta (por ejemplo, etiqueta epitópica tal como el epítipo FLAG, etiqueta enzimática tal como peroxidasa de rábano picante, etc.). El marcador puede estar unido a un compañero de unión del polipéptido, o incorporado en la estructura del compañero de unión.

Se pueden usar una variedad de métodos para detectar la etiqueta, dependiendo de la naturaleza del marcador y otros componentes del ensayo. Por ejemplo, el marcador puede detectarse mientras está unido al sustrato sólido o después de la separación del sustrato sólido. Los marcadores pueden detectarse directamente a través de densidad óptica o de electrones, emisiones radiactivas, transferencias de energía no radiativas, etc. o pueden detectarse indirectamente con conjugados de anticuerpos, conjugados de estreptavidina-biotina, etc. Los métodos para detectar los marcadores son bien conocidos en la técnica.

La divulgación proporciona agentes de unión específicos de polipéptidos, métodos para identificar y preparar tales agentes, y su uso en el diagnóstico, la terapia y el desarrollo farmacéutico. Por ejemplo, los agentes farmacológicos específicos de polipéptidos son útiles en una variedad de aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas, especialmente cuando la enfermedad o el pronóstico de la enfermedad se asocia con características de unión de polipéptido alteradas. Los nuevos agentes de unión específicos de polipéptidos incluyen anticuerpos específicos de polipéptidos, receptores de superficie celular y otros agentes de unión intracelulares y extracelulares naturales identificados con ensayos tales como dos pantallas híbridas y agentes de unión intracelulares y extracelulares no naturales identificados en cribados de bibliotecas químicas y similares.

En general, la especificidad de la unión de polipéptidos a una molécula específica se determina mediante el enlace de constantes de equilibrio. Las dianas que son capaces de unirse selectivamente a un polipéptido preferiblemente tienen constantes de equilibrio de unión de al menos aproximadamente 10^7 M^{-1} , más preferiblemente al menos aproximadamente 10^8 M^{-1} , y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 10^9 M^{-1} . Se puede usar una amplia variedad de ensayos basados en células y libres de células para demostrar la unión específica del polipéptido. Los ensayos basados en células incluyen una, dos y tres cribados híbridos, ensayos en los que la transcripción mediada por polipéptidos se inhibe o aumenta, etc. Los ensayos libres de células incluyen ensayos de unión a proteínas, inmunoensayos, etc. Otros ensayos útiles para seleccionar agentes que se unen a polipéptidos incluyen resonancia de fluorescencia transferencia de energía (FRET) y análisis de desplazamiento de movilidad electroforética (EMSA).

De acuerdo con todavía otro aspecto de la divulgación, se proporciona un método para diagnosticar un trastorno caracterizado por la expresión aberrante de una molécula de ácido nucleico, un producto de expresión del mismo, o un fragmento de un producto de expresión del mismo. El método implica poner en contacto una muestra biológica aislada de un sujeto con un agente que se une específicamente a la molécula de ácido nucleico, un producto de expresión de la

5 misma, o un fragmento de un producto de expresión de la misma, y determinar la interacción entre el agente y la molécula de ácido nucleico o el producto de expresión como una determinación del trastorno, en el que la molécula de ácido nucleico es un ácido nucleico de IL1RL-1 (SEQ ID NO. 1). En algunas realizaciones, el trastorno es una afección cardiovascular seleccionada del grupo que consiste en infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, arteriosclerosis e insuficiencia cardíaca. En una realización, el trastorno es hipertrofia cardíaca. En otra realización, el trastorno es un infarto de miocardio. En una realización, el trastorno es insuficiencia cardíaca.

10 En el caso en el que la molécula es una molécula de ácido nucleico, tales determinaciones se pueden llevar a cabo mediante cualquier ensayo de determinación de ácido nucleico estándar, que incluye la reacción en cadena de la polimerasa o ensayo con sondas de hibridación marcadas como se ejemplifica aquí. En el caso en el que la molécula es un producto de expresión de la molécula de ácido nucleico, o un fragmento de un producto de expresión de la molécula de ácido nucleico, dicha determinación puede llevarse a cabo mediante cualquier ensayo inmunológico estándar usando, por ejemplo, anticuerpos que se unen a cualquier de los productos de expresión polipeptídicos.

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

25 Cuando el trastorno es una afección cardiovascular seleccionada del grupo que consiste en hipertrofia cardíaca, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, arteriosclerosis, e insuficiencia cardíaca, la expresión disminuida de cualquiera de las moléculas anteriores en comparación con un control (por ejemplo, un sujeto sano) es indicadora de la presencia del trastorno, o indicadora del riesgo a desarrollar dicho trastorno en el futuro. También se divulgan kits. En una realización, un kit comprende un paquete que contiene un agente que se une selectivamente a un ácido nucleico aislado de IL1RL-1, o un producto de expresión del mismo, y un control para comparar con un valor medido de unión de dicho agente cualquiera de los ácidos nucleicos aislados anteriores, o productos de expresión de los mismos. Los kits generalmente están compuestos por los siguientes elementos principales: empaque, un agente de la divulgación, un agente de control e instrucciones. El empaque puede ser una estructura en forma de caja para contener un vial (o número de viales) que contiene un agente de la divulgación, un vial (o número de viales) que contiene un agente de control, e instrucciones. Los expertos en la técnica pueden modificar fácilmente el empaque para adaptarse a las necesidades individuales. En algunas realizaciones, el control es un valor predeterminado para comparar con el valor medido. En ciertas realizaciones, el control comprende un epítipo del producto de expresión de cualquiera de los ácidos nucleicos aislados anteriores.

35 En el caso de la detección de ácidos nucleicos, se pueden incluir pares de cebadores para amplificar una molécula de ácido nucleico de la divulgación. Los kits preferidos incluirían cantidades conocidas de sondas de ácido nucleico, epítipos (tales como productos de expresión de IL1RL-1) o anticuerpos anti-epítipo, así como instrucciones u otro material impreso. En ciertas realizaciones, el material impreso puede caracterizar el riesgo de desarrollar una afección cardiovascular en base al resultado del ensayo. Los reactivos pueden empacarse en recipientes y/o recubrirse en pozos en cantidades predeterminadas, y los kits pueden incluir materiales estándar tales como reactivos inmunológicos marcados (tales como anticuerpos anti-IgG marcados) y similares. Un kit es una placa de microtitulación de poliestireno empacada recubierta con cualquiera de las proteínas anteriores de la divulgación y un recipiente que contiene anticuerpos IgG antihumanos marcados. Un pozo de la placa se pone en contacto con, por ejemplo, un fluido biológico, se lava y luego se pone en contacto con el anticuerpo anti-IgG. La etiqueta luego es detectada. Un kit que incorpora características de la presente divulgación, generalmente designado por el número 11, se ilustra en la Figura 7. El kit 11 está compuesto por los siguientes elementos principales: empaque 15, un agente de la divulgación 17, un agente de control 19 e instrucciones 21. El empaque 15 es una estructura tipo caja para alojar un vial (o número de viales) que contiene un agente de la divulgación 17, un vial (o número de viales) que contiene un agente de control 19, y las instrucciones 21. Individuos con experiencia en la técnica puede modificar fácilmente el empaque 15 para satisfacer las necesidades individuales,

55 En realizaciones preferidas, la divulgación proporciona nuevos kits o ensayos que son específicos para, y tienen sensibilidad apropiada con respecto a, valores predeterminados seleccionados sobre la base de la presente divulgación. Los kits preferidos, por lo tanto, diferirían de los actualmente disponibles en el mercado, incluyendo, por ejemplo, diferentes límites, diferentes sensibilidades en límites particulares, así como instrucciones u otro material impreso para caracterizar el riesgo en función del resultado del ensayo. .

60 La divulgación también abarca métodos para evaluar la probabilidad de que un sujeto se beneficiará del tratamiento con un agente para reducir el riesgo de una afección cardiovascular. En algunas realizaciones el agente se selecciona del grupo que consiste en un agente antiinflamatorio, un agente antitrombótico, un agente antiplaquetario, un agente fibrinolítico, un agente hipolipemiente, un inhibidor directo de la trombina, un inhibidor del receptor de glicoproteína IIb/IIIa, un agente que une las moléculas de adhesión celular e inhibe la capacidad de los leucocitos para unirse a tales moléculas, un bloqueador del canal de calcio, un bloqueador del receptor beta-adrenérgico, un inhibidor de la

ciclooxigenasa-2 y un inhibidor del sistema de angiotensina. El procedimiento implica la obtención de un nivel de una molécula IL1RL-1 en el sujeto, y la comparación del nivel de la molécula IL1RL-1 a un valor predeterminado específico para el diagnóstico de una afección cardiovascular. El nivel de la molécula IL1RL-1 en comparación con el valor predeterminado es indicativo de si el sujeto se beneficiará del tratamiento con dicho agente. En ciertas realizaciones, el valor predeterminado específico para el diagnóstico de una afección cardiovascular es una pluralidad de intervalos de nivel marcador predeterminados y dicha etapa de comparación comprende determinar en cual, de dichos intervalos de nivel del marcador predeterminado, se incluye el nivel de dichos sujetos. La afección cardiovascular puede ser una afección seleccionada del grupo que consiste en hipertrofia cardíaca, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, arteriosclerosis, e insuficiencia cardíaca.

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

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

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

La divulgación también abarca métodos para tratar una afección cardiovascular. En algunas realizaciones, el método implica administrar a un sujeto que necesita tal tratamiento una molécula de IL1RL-1, en una cantidad efectiva para tratar la afección cardiovascular. En ciertas realizaciones, el método implica administrar a un sujeto que necesita tal tratamiento un agente que modula la expresión de cualquiera de las moléculas IL1RL-1 anteriores. Los "agentes que modulan la expresión" incluyen cualquiera de las moléculas IL1RL-1 descritas aquí, agentes que aumentan la expresión de estas moléculas, así como agentes que disminuyen la expresión de cualquiera de las moléculas IL1RL-1 anteriores, en una cantidad efectiva para tratar la enfermedad cardiovascular condición.

Los "agentes que disminuyen la expresión" de un ácido nucleico o un polipéptido, como se usan en la presente memoria, son conocidos en la técnica y se refieren a ácidos nucleicos antisentido, anticuerpos que unen polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos y otros agentes que disminuyen la expresión de tales moléculas. Cualquier agente que disminuya la expresión de una molécula (y como se describe en la presente memoria, disminuye su actividad), es útil. En ciertas realizaciones, la molécula es un ácido nucleico (antisentido). En algunas realizaciones, el ácido nucleico se acopla operativamente a una secuencia de expresión génica que dirige la expresión de la molécula de ácido nucleico dentro de un cardiomiocito. La "secuencia de expresión génica" es cualquier secuencia de nucleótidos reguladora, tal como una secuencia promotora o una combinación promotor-potenciador, que facilita la transcripción y traducción eficiente del ácido nucleico al que se une operativamente. La secuencia de expresión génica puede ser, por ejemplo, un promotor mamífero o viral, tal como un promotor constitutivo o inducible. Los promotores constitutivos de mamífero incluyen, pero no se limitan a, los promotores para los siguientes genes: hipoxantina fosforribosil transferasa (HPTR), adenosina desaminasa, piruvato quinasa, promotor de α -actina y otros promotores constitutivos. Los ejemplos de promotores virales que funcionan constitutivamente en células eucarióticas incluyen, por ejemplo, promotores del virus simio, virus del papiloma, adenovirus, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus del sarcoma de Rous, citomegalovirus, las repeticiones terminales largas (LTR) del virus de la leucemia de Moloney y otros retrovirus y el promotor de la timidina quinasa del virus del herpes simple. Otros promotores constitutivos son conocidos por los expertos en la técnica. Los promotores útiles como secuencias de expresión génica de la divulgación también incluyen promotores inducibles. Los promotores inducibles se activan en presencia de un agente inductor. Por ejemplo, el promotor metalotioneína se activa para aumentar la transcripción y la traducción en presencia de ciertos iones metálicos. Otros promotores inducibles son conocidos por los expertos en la técnica.

En general, la secuencia de expresión génica incluirá, según sea necesario, secuencias 5' no transcriptoras y 5' no traductoras implicadas con el inicio de la transcripción y traducción, respectivamente, tales como una caja TATA, secuencia de cubrimiento, secuencia CAAT, y similares. Especialmente, tales secuencias 5' que no se transcriben incluirán una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control transcripcional del ácido nucleico

unido de manera operativa. Las secuencias de expresión génica incluyen opcionalmente secuencias potenciadoras o secuencias activadoras corriente arriba según se desee.

Preferiblemente, cualquiera de las moléculas de ácido nucleico IL1RL-1 divulgadas está enlazada a una secuencia de expresión génica que permite la expresión de la molécula de ácido nucleico en una célula tal como un cardiomiocito y/o una célula endotelial vascular (que incluye una célula de músculo liso). Más preferiblemente, la secuencia de expresión génica permite la expresión de la molécula de ácido nucleico en un cardiomiocito, y no permite la expresión de la molécula en una célula seleccionada del grupo que consiste en una célula neuronal, un fibroblasto y una célula de origen hematopoyético. Una secuencia que permite la expresión de la molécula de ácido nucleico en un cardiomiocito, es una que es selectivamente activa en dicho tipo de célula, causando con ello la expresión de la molécula de ácido nucleico en la célula. El promotor del gen de la cadena pesada de la miosina cardíaca, por ejemplo, puede usarse para expresar cualquiera de las moléculas de ácido nucleico anteriores de la divulgación en un cardiomiocito. Los expertos en la técnica podrán identificar fácilmente promotores alternativos que sean capaces de expresar una molécula de ácido nucleico en un cardiomiocito.

Se dice que la secuencia de ácidos nucleicos y la secuencia de expresión génica están "unidas operativamente" cuando están enlazadas covalentemente de tal manera que colocan la transcripción y/o traducción de la secuencia codificante de ácido nucleico bajo la influencia o control de la secuencia de expresión génica. Si se desea que la secuencia de ácidos nucleicos se traduzca en una proteína funcional, se dice que dos secuencias de ADN se unen operativamente si la inducción de un promotor en la secuencia de expresión génica 5' da como resultado la transcripción de la secuencia de ácidos nucleicos y si la naturaleza del enlace entre las dos secuencias de ADN no (1) da como resultado la introducción de una mutación de cambio de marco, (2) interfiere con la capacidad de la región promotora para dirigir la transcripción de la secuencia de ácidos nucleicos, y/o (3)) interfieren con la capacidad del transcrito de ARN correspondiente para traducirse en una proteína. Por lo tanto, una secuencia de expresión génica estaría operativamente enlazada a una secuencia de ácidos nucleicos si la secuencia de expresión génica fuera capaz de efectuar la transcripción de esa secuencia de ácidos nucleicos de manera que el transcrito resultante podría traducirse en la proteína o polipéptido deseado.

Las moléculas de la divulgación se pueden suministrar a los tipos celulares preferidos de la divulgación sola o en asociación con un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar: (1) el suministro de una molécula a una célula diana y/o (2) la absorción de la molécula por una célula diana. Preferiblemente, los vectores transportan la molécula a la célula diana con degradación reducida en relación con el grado de degradación que daría como resultado la ausencia del vector. Opcionalmente, se puede unir un "ligando de direccionamiento" al vector para administrar selectivamente el vector a una célula que expresa en su superficie el receptor afín para el ligando de direccionamiento. De esta manera, el vector (que contiene un ácido nucleico o una proteína) puede suministrarse selectivamente a una célula de cardiomiocitos en, por ejemplo, el miocardio. Las metodologías para dirigir incluyen conjugados, tales como los descritos en la patente de los Estados Unidos 5.391.723 de Priest. Otro ejemplo de un vehículo de direccionamiento bien conocido es un liposoma. Los liposomas están disponibles en el mercado en Gibco BRL (Life Technologies Inc., Rockville, MD). Se publican numerosos métodos para fabricar liposomas dirigidos. Preferiblemente, las moléculas de la divulgación están dirigidas a la administración a cardiomiocitos y/o células endoteliales vasculares.

En general, los vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, fagémidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes víricas o bacterianas que se han manipulado mediante la inserción o incorporación de las secuencias de ácido nucleico de la divulgación y fragmentos de ácido nucleico adicionales (por ejemplo, potenciadores, promotores) que se pueden unir a las secuencias de ácido nucleico de la divulgación. Los vectores virales son un tipo preferido de vector e incluyen, pero no se limitan a, secuencias de ácido nucleico de los siguientes virus: adenovirus; virus adeno-asociado; retrovirus, tal como el virus de la leucemia murina Moloney; Virus del sarcoma murino Harvey; virus de tumor mamario murino; virus del sarcoma de Rouse; Virus de tipo SV40; virus de polio; Virus Epstein-Barr; virus del papiloma; virus del herpes; virus vaccinia; virus de la polio; y virus de ARN tales como un retrovirus. Se pueden emplear fácilmente otros vectores no nombrados, pero conocidos en la técnica.

Un virus particularmente preferido para ciertas aplicaciones es el virus adenoasociado, un virus de ADN de doble cadena. El virus adenoasociado es capaz de infectar un amplio rango de tipos de células y especies y puede diseñarse para que sea deficiente en replicación, es decir, capaz de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaz de fabricar una partícula infecciosa. Tiene además ventajas, como estabilidad al calor y al disolvente lipídico, altas frecuencias de transducción en células de diversos linajes, incluidas las células hematopoyéticas, y la falta de inhibición de la superinfección, lo que permite múltiples series de transducciones. Según se informa, el virus adenoasociado puede integrarse en células humanas ADN de una manera específica del sitio, minimizando así la posibilidad de mutagénesis insercional y variabilidad de la expresión génica insertada. Además, se han seguido infecciones de virus adenoasociados de tipo silvestre en cultivo de tejidos durante más de 100 pases en ausencia de presión selectiva, lo que implica que la integración genómica del virus adenoasociado es un evento relativamente estable. El virus adenoasociado también puede funcionar de forma extracromosómica.

En general, otros vectores víricos preferidos se basan en virus eucarióticos no citopáticos en los que los genes no esenciales se han reemplazado por el gen de interés. Los virus no citopáticos incluyen retrovirus, cuyo ciclo de vida implica la transcripción inversa del ARN viral genómico en ADN con la posterior integración proviral en el ADN celular

- del huésped. Los adenovirus y retrovirus han sido aprobados para ensayos de terapia génica humana. En general, los retrovirus son deficientes en la replicación. Tales vectores de expresión retrovirales genéticamente alterados tienen utilidad general para la transducción de genes de alta eficacia in vivo. Protocolos estándar para producir retrovirus deficientes en replicación (incluyendo los pasos de incorporación de material genético exógeno en un plásmido, transfección de una línea celular de empaquetamiento con plásmido, producción de retrovirus recombinantes por la línea celular de empaquetamiento, recolección de partículas virales de medios de cultivo tisular e infección de las células diana con partículas virales) se proporcionan en Kriegler, M., "Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual," W.H. Freeman C.O., New York (1990) y Murry, E.J. Ed. "Methods in Molecular Biology," vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, New Jersey (1991)..
- Otro vector retroviral preferido es el vector derivado del virus de la leucemia murina de Moloney, como se describe en Nabel, E.G., et al., Science, 1990, 249: 1285-1288. Supuestamente, estos vectores fueron efectivos para la administración de genes a las tres capas de la pared arterial, incluidos la media. Otros vectores preferidos se divulgan en Flugelman, et al., Circulation, 1992, 85: 1110-1117. Se divulgan vectores adicionales que son útiles para suministrar moléculas de la divulgación en la patente de Estados Unidos N° 5.674.722 de Mulligan, et al.
- Además de los vectores anteriores, se pueden usar otros métodos de administración para administrar una molécula de la invención a una célula tal como un cardiomiocito y/o una célula endotelial vascular, y facilitar así la captación, Un método de entrega preferido de este tipo es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal preferido es un liposoma. Los liposomas son vasos de membrana artificiales que son útiles como vectores de administración in vivo o in vitro. Se ha demostrado que los grandes vasos unilamelares (LUV), que varían en tamaño desde 0,2 - 4,0 µm pueden encapsular macromoléculas grandes. El ARN, el ADN y los viriones intactos pueden encapsularse dentro del interior acuoso y administrarse a las células en una forma biológicamente activa (Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., 1981, 6:77). Para que un liposoma sea un vector de transferencia génica eficiente, deben estar presentes una o más de las siguientes características: (1) encapsulación del gen de interés con alta eficacia con retención de actividad biológica; (2) unión preferencial y sustancial a una célula diana en comparación con células no diana; (3) suministro de los contenidos acuosos de la vesícula al citoplasma de la célula diana con alta eficiencia; y (4) expresión precisa y efectiva de la información genética.
- Los liposomas pueden dirigirse a un tejido particular, tal como el miocardio o la pared de la célula vascular, acoplando el liposoma a un ligando específico tal como un anticuerpo monoclonal, azúcar, glicolípido o proteína. Los ligandos que pueden ser útiles para dirigir un liposoma a la pared vascular incluyen, pero no se limitan a, la proteína de cubierta viral del virus Hemaglutinante de Japón. Adicionalmente, el vector se puede acoplar a un péptido de direccionamiento nuclear, que dirigirá el ácido nucleico al núcleo de la célula huésped.
- Los liposomas están disponibles comercialmente en Gibco BRL, por ejemplo, como LIPOFECTIN™ y LIPOFECTACE™, que están formados por lípidos catiónicos tales como cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi) -propil] -N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) y bromuro de dimetil dioctadecilamonio (DDAB). Los métodos para fabricar liposomas son bien conocidos en la técnica y se han descrito en muchas publicaciones. Los liposomas también han sido revisados por Gregoriadis, G. en Trends in Biotechnology, V. 3, p. 235-241 (1985). Nuevos liposomas para la administración intracelular de macromoléculas, incluyendo ácidos nucleicos, también se describen en la solicitud Internacional PCT No. PCT/US96/07572 (publicación número WO 96/40060, titulada "Suministro intracelular de macromoléculas").
- En una realización particular, el vehículo preferido es una micropartícula o un implante biocompatible que es adecuado para la implantación en el receptor de mamífero. Los ejemplos de implantes bioerosionables que son útiles de acuerdo con este método se describen en la solicitud internacional PCT no. PCT/US95/03307 (publicación No. WO 95/24929, titulada "Sistema de suministro de genes poliméricos", que reivindica la prioridad de la solicitud de patente de Estados Unidos N° de serie 213.668, presentada el 15 de marzo de 1994). El documento PCT/US95/03307 describe una matriz polimérica biocompatible, preferiblemente biodegradable, para contener un gen exógeno bajo el control de un promotor apropiado. La matriz polimérica se usa para lograr la liberación sostenida del gen exógeno en el paciente. De acuerdo con la presente divulgación, los ácidos nucleicos descritos en este documento están encapsulados o dispersados dentro de la matriz polimérica biocompatible, preferiblemente biodegradable, revelada en PCT/US95/03307. La matriz polimérica preferiblemente está en forma de una micropartícula tal como una microesfera (en la que un ácido nucleico se dispersa a través de una matriz polimérica sólida) o una microcápsula (en la que se almacena un ácido nucleico en el núcleo de una cubierta polimérica). Otras formas de la matriz polimérica para contener los ácidos nucleicos de la divulgación incluyen películas, recubrimientos, geles, implantes y stents. El tamaño y la composición del dispositivo de matriz polimérica se seleccionan para producir una cinética de liberación favorable en el tejido en el que se implanta el dispositivo de matriz. El tamaño del dispositivo de matriz polimérica adicionalmente se selecciona de acuerdo con el método de administración que se va a usar, típicamente inyección en un tejido o administración de una suspensión por aerosol en las áreas nasal y/o pulmonar. La composición de la matriz polimérica puede seleccionarse para tener tasas de degradación favorables y también para formarse de un material que sea bioadhesivo, para aumentar adicionalmente la eficacia de la transferencia cuando el dispositivo se administra a una superficie vascular. La composición de la matriz también se puede seleccionar para que no se degrade, sino que se libere por difusión durante un período de tiempo prolongado.

Ambas matrices poliméricas biodegradables y no biodegradables se pueden usar para suministrar los ácidos nucleicos de la divulgación al sujeto. Se prefieren las matrices biodegradables. Tales polímeros pueden ser polímeros naturales o sintéticos. Se prefieren los polímeros sintéticos. El polímero se selecciona en función del período de tiempo durante el cual se desea la liberación, generalmente del orden de unas pocas horas a un año o más. Típicamente, la liberación durante un período que varía entre unas pocas horas y tres hasta doce meses es lo más deseable. El polímero está opcionalmente en forma de un hidrogel que puede absorber hasta aproximadamente el 90% de su peso en agua y además, opcionalmente está entrecruzado con iones multivalentes u otros polímeros.

En general, los ácidos nucleicos de la invención se administran usando el implante bioerosionable por medio de difusión, o más preferiblemente, por degradación de la matriz polimérica. ejemplos de polímeros sintéticos que pueden ser utilizados para formar el sistema de suministro biodegradable incluyen: poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, polialquilenglicoles, óxidos de polialquileno, tereftalatos de polialquileno, alcoholes de polivinilo, éteres de polivinilo, ésteres de polivinilo, haluros de polivinilo, poliglicólidos, polisiloxanos, poliuretanos y copolímeros de los mismos, alquil celulosa, hidroxialquil celulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitrocelulosas, polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, metil celulosa hidroxibutilo, acetato de celulosa, propionato de celulosa, acetato butirato de celulosa, acetato ftalato de celulosa, celulosa carboxiletil, triacetato de celulosa, sal de celulosa sulfato de sodio, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(isodecilmecacrilato), poli(metacrilato de laurilo) , poli(fenilmecacrilato), poli(acrilato de metilo), poli(isopropilacrilato), poli(isobutilacrilato), poli(octadecylacrylate), polietileno, polipropileno, poli(etilenglicol), poli(óxido de etileno), poli(tereftalato de etileno), poli(alcoholes vinílicos), acetato de polivinilo , poli cloruro de vinilo, poliestireno y polivinilpirrolidona.

Ejemplos de polímeros no biodegradables incluyen etileno acetato de vinilo, ácido poli(met) acrílico, poliamidas, copolímeros y mezclas de los mismos.

Ejemplos de polímeros biodegradables incluyen polímeros sintéticos tales como polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, polianhídridos, poli(orto)ésteres, poliuretanos, poli(ácido butílico), poli(ácido valérico) y poli(lactidocaprolactona) y polímeros naturales. tales como alginato y otros polisacáridos que incluyen dextrano y celulosa, colágeno, derivados químicos de los mismos (sustituciones, adiciones de grupos químicos, por ejemplo, alquilo, alquilenos, hidroxilaciones, oxidaciones y otras modificaciones rutinariamente realizadas por los expertos en la técnica), albúmina y otras proteínas hidrofílicas, zeína y otras prolaminas y proteínas hidrofóbicas, copolímeros y mezclas de los mismos. En general, estos materiales se degradan por hidrólisis enzimática o exposición al agua in vivo, por erosión superficial o en masa.

Los polímeros bioadhesivos de particular interés incluyen hidrogeles bioerosionables descritos por H.S. Sawhney, C.P. Pathak y J.A. Hubell en *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587, ácidos polihialurónicos, caseína, gelatina, glutina, polianhídridos, ácido poliacrílico, alginato, quitosano, poli(metacrilatos de metilo), poli(metacrilatos de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(isobutilo) metacrilato), poli(metacrilato de hexil), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo) y poli(acrilato de octadecilo) .

Los agentes de compactación también se pueden usar en combinación con un vector de la divulgación. Un "agente de compactación", como se usa en el presente documento, se refiere a un agente, tal como una histona, que neutraliza las cargas negativas sobre el ácido nucleico y de ese modo permite la compactación del ácido nucleico en un gránulo fino. La compactación del ácido nucleico facilita la absorción del ácido nucleico por la célula diana. Los agentes de compactación se pueden usar solos, por ejemplo, para administrar un ácido nucleico aislado de la descripción en una forma que sea absorbida más eficazmente por la célula o, más preferiblemente, en combinación con uno o más de los vectores descritos anteriormente.

Otras composiciones de ejemplo que pueden usarse para facilitar la captación por una célula diana de los ácidos nucleicos de la divulgación incluyen fosfato de calcio y otros mediadores químicos del transporte intracelular, composiciones de microinyección, electroporación y composiciones de recombinación homóloga (por ejemplo, para integrar un ácido nucleico en una ubicación preseleccionada dentro del cromosoma de la célula diana).

El término "facilitar la absorción" de una molécula en una célula tiene los siguientes significados dependiendo de la naturaleza de la molécula. Para un ácido nucleico aislado, se pretende describir la entrada del ácido nucleico a través de la membrana celular y al núcleo celular, donde sobre el "transgén de ácido nucleico" puede utilizarse la maquinaria celular para producir polipéptidos funcionales codificados por el ácido nucleico. Por "transgén de ácido nucleico" se pretende describir todos los ácidos nucleicos de la divulgación con o sin los vectores asociados. Para un polipéptido, se pretende describir la entrada del polipéptido a través de la membrana celular y dentro del citoplasma celular, y si es necesario, la utilización de la maquinaria citoplásmica celular para modificar funcionalmente el polipéptido (por ejemplo, a una forma activa).

Se pueden emplear varias técnicas para introducir ácidos nucleicos en las células, dependiendo de si los ácidos nucleicos se introducen in vitro o in vivo en un huésped. Tales técnicas incluyen la transfección de ácido nucleico-precipitados de CaPO_4 , la transfección de ácidos nucleicos asociados con DEAE, la transfección con un retrovirus que incluye el ácido nucleico de interés, la transfección mediada por liposomas y similares. Para ciertos usos, se prefiere

dirigir el ácido nucleico a células particulares. En tales casos, un vehículo utilizado para administrar un ácido nucleico en una célula (por ejemplo, un liposoma, un retrovirus u otro virus) puede tener una molécula de direccionamiento unida a la misma. Por ejemplo, una molécula tal como un anticuerpo específico para una proteína de membrana de superficie en la célula diana o un ligando para un receptor en la célula diana puede unirse o incorporarse dentro del vehículo de suministro de ácido nucleico. Por ejemplo, cuando se emplean liposomas para administrar los ácidos nucleicos de la descripción, las proteínas que se unen a una proteína de membrana superficial asociada con endocitosis se pueden incorporar a la formulación de liposomas para dirigir y/o facilitar la captación. Tales proteínas incluyen proteínas de la cápside o fragmentos de las mismas trópicos para un tipo de célula particular, anticuerpos para proteínas que experimentan internalización en el ciclo, proteínas que se dirigen a la localización intracelular y potencian la vida media intracelular, y similares. Los sistemas de administración poliméricos también se han usado con éxito para liberar ácidos nucleicos en las células, como es conocido por los expertos en la técnica. Tales sistemas incluso permiten la administración oral de ácidos nucleicos.

La divulgación también proporciona métodos para el diagnóstico y la terapia de trastornos vasculares y cardiovasculares. Dichos trastornos incluyen infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, arteriosclerosis, insuficiencia cardíaca e hipertrofia cardíaca. Tales métodos son útiles tanto en el tratamiento agudo como profiláctico de cualquiera de las afecciones anteriores. Como se usa en este documento, un tratamiento agudo se refiere al tratamiento de sujetos que tienen una afección particular. El tratamiento profiláctico se refiere al tratamiento de sujetos en riesgo de tener la afección, pero que actualmente no tienen o experimentan los síntomas de la afección.

En su sentido más amplio, los términos "tratamiento" o "tratar" se refieren a tratamientos tanto agudos como profilácticos. Si el sujeto que necesita tratamiento está experimentando una condición (o tiene o está teniendo una condición particular), entonces tratar la condición se refiere a mejorar, reducir o eliminar la condición o uno o más síntomas que surgen de la condición. En algunas realizaciones preferidas, tratar la condición se refiere a mejorar, reducir o eliminar un síntoma específico o un subconjunto específico de síntomas asociados con la afección. Si el sujeto que necesita tratamiento es uno que está en riesgo de padecer una afección, entonces tratar al sujeto se refiere a reducir el riesgo de que el sujeto tenga la afección.

El accidente cerebrovascular (también denominado accidente cerebrovascular isquémico o isquemia cerebrovascular) a menudo se cita como la tercera causa más común de muerte en el mundo industrial, clasificándose detrás de la enfermedad cardíaca isquémica y el cáncer. Los accidentes cerebrovasculares son responsables de cerca de 300,000 muertes anuales en los Estados Unidos y son una causa principal de ingresos hospitalarios y discapacidades a largo plazo. En consecuencia, el impacto socioeconómico del accidente cerebrovascular y su carga concomitante en la sociedad es prácticamente inconmensurable.

"Accidente cerebrovascular" es definido por la Organización Mundial de la Salud como un signo clínico en rápido desarrollo de alteración focal o global de la función cerebral con síntomas que duran al menos 24 horas. Los accidentes cerebrovasculares también están implicados en muertes en las que no hay una causa aparente que no sea un efecto de origen vascular.

Los accidentes cerebrovasculares suelen ser causados por obstrucciones u oclusiones de los vasos sanguíneos al cerebro o dentro del cerebro. Con la oclusión completa, la detención de la circulación cerebral provoca el cese de la actividad eléctrica neuronal en segundos. Dentro de unos minutos después del deterioro del estado de energía y la homeostasis iónica, se produce el agotamiento de fosfatos de alta energía, falla de la bomba de iones de membrana, eflujo de potasio celular, influjo de cloruro de sodio y agua y despolarización de la membrana. Si la oclusión persiste durante más de cinco a diez minutos, se produce un daño irreversible. Sin embargo, con la isquemia incompleta, el resultado es difícil de evaluar y depende en gran medida de la perfusión residual y la disponibilidad de oxígeno. Después de una oclusión trombótica de un vaso cerebral, la isquemia rara vez es total. En general, persiste cierta perfusión residual en el área isquémica, dependiendo del flujo sanguíneo colateral y de la presión de perfusión local.

El flujo sanguíneo cerebral puede compensar las caídas en la presión arterial media de 90 a 60 mm Hg por autorregulación. Este fenómeno implica la dilatación de los vasos resistentes corriente abajo. Por debajo del nivel más bajo de autorregulación (alrededor de 60 mm Hg), la vasodilatación es inadecuada y el flujo sanguíneo cerebral disminuye. El cerebro, sin embargo, tiene reservas de perfusión que pueden compensar la caída en el flujo sanguíneo cerebral. Esta reserva existe porque en condiciones normales solo se extrae aproximadamente el 35% del oxígeno administrado por la sangre. Por lo tanto, puede tener lugar una mayor extracción de oxígeno, siempre que exista normoxia y normocapnea. Cuando la presión arterial distal desciende por debajo de aproximadamente 30 mm Hg, los dos mecanismos compensatorios (autorregulación y reserva de perfusión) son inadecuados para evitar la falla del suministro de oxígeno.

A medida que el flujo sanguíneo cae por debajo del umbral isquémico de 23 ml/100 g/minuto, se desarrollan síntomas de hipoxia tisular. La isquemia severa puede ser letal. Cuando la isquemia es moderada, dará como resultado "penumbra". En el contexto neurológico, penumbra se refiere a una zona del tejido cerebral con isquemia moderada y función neuronal paralizada, que es reversible con la restauración de la perfusión adecuada. La penumbra forma una zona de tejido perfundido de forma colateral que rodea un núcleo de isquemia grave en la que se ha desarrollado un infarto. En otras palabras, la penumbra es el área de tejido que se puede guardar, y se encuentra esencialmente en un estado entre la vida y la muerte.

Aunque un evento isquémico puede ocurrir en cualquier parte del sistema vascular, la bifurcación de la arteria carótida y el origen de la arteria carótida interna son los sitios más frecuentes para las oclusiones tromboticas de los vasos sanguíneos cerebrales, que resultan en isquemia cerebral. Los síntomas de flujo sanguíneo reducido debido a estenosis o trombosis son similares a los causados por la enfermedad de la arteria cerebral media. El flujo a través de la arteria oftálmica a menudo se ve afectado lo suficiente como para producir amaurosis fugax o ceguera monocular transitoria. La estenosis bilateral grave de la arteria carótida interna puede provocar hipoperfusión hemisférica cerebral. Esto se manifiesta con cefalea aguda ipsilateral al hemisferio isquémico agudo. Las oclusiones o la disminución del flujo sanguíneo con la isquemia resultante de una arteria cerebral anterior distal a la arteria comunicante anterior produce síntomas sensoriales motores y corticales en la pierna contralateral y, con menos frecuencia, en el brazo proximal. Otras manifestaciones de oclusiones o subperfusión de la arteria cerebral anterior incluyen la ataxia de la marcha y, en ocasiones, la incontinencia urinaria debido al daño del lóbulo frontal parasagital. Los trastornos del lenguaje que se manifiestan como disminución del habla espontánea pueden acompañar a la depresión generalizada de la actividad psicomotora.

La mayoría de los accidentes cerebrovasculares isquémicos involucran porciones o todo el territorio de la arteria cerebral media con embolias del corazón o arterias carótidas extracraneales que representan la mayoría de los casos. Las embolias pueden ocluir el tallo principal de la arteria cerebral media, pero con mayor frecuencia producen una oclusión distal de la rama superior o inferior. Las oclusiones de la rama superior causan debilidad y pérdida sensorial que son mayores en la cara y el brazo. Las oclusiones de la arteria cerebral posterior distal a sus ramas penetrantes causan pérdida completa de visión contralateral. Dificultad en la lectura (dislexia) y en la realización de cálculos (discalculia) pueden seguir a la isquemia de la arteria cerebral posterior dominante. La oclusión proximal de la arteria cerebral posterior causa isquemia de las ramas que penetran en las estructuras camogénica y límbica. Los resultados clínicos son alteraciones hemisensorias que pueden cambiar crónicamente a dolor intratable del lado defectuoso (dolor talámico).

Un sujeto que tiene un accidente cerebrovascular es diagnosticado por los síntomas experimentados y/o por un examen físico que incluye herramientas de diagnóstico intervencionales y no intervencionales, tales como la formación de imágenes de TC y la RM. Los métodos de la divulgación son ventajosos para el tratamiento de diversas presentaciones clínicas de sujetos con accidente cerebrovascular. Un sujeto que tiene un accidente cerebrovascular puede presentar uno o más de los siguientes síntomas: parálisis, debilidad, disminución de la sensibilidad y/o visión, entumecimiento, hormigueo, afasia (por ejemplo, incapacidad para hablar o dificultad para hablar, dificultad para leer o escribir), agnosia (es decir, incapacidad para reconocer o identificar estímulos sensoriales), pérdida de memoria, dificultades de coordinación, letargo, somnolencia o inconsciencia, falta de control de la vejiga o del intestino y deterioro cognitivo (por ejemplo, demencia, capacidad de concentración limitada, incapacidad para concentrarse). Utilizando técnicas de imágenes médicas, puede ser posible identificar a un sujeto que tiene un accidente cerebrovascular como uno que tiene un infarto o que tiene una hemorragia en el cerebro.

Una realización importante de la divulgación es el tratamiento de un sujeto con un riesgo anormalmente elevado de un accidente cerebrovascular isquémico. Como se usa en el presente documento, los sujetos que tienen un riesgo anormalmente elevado de un accidente cerebrovascular isquémico son una categoría determinada de acuerdo con la práctica médica convencional (véase la discusión anterior); tales sujetos también se pueden identificar en la práctica médica convencional como que tienen factores de riesgo conocidos para el accidente cerebrovascular o que tienen un mayor riesgo de eventos cerebrovasculares. Esta categoría incluye, por ejemplo, sujetos que tienen cirugía vascular electiva. Por lo general, los factores de riesgo asociados con la enfermedad cardíaca son los mismos que los asociados con el accidente cerebrovascular. Los principales factores de riesgo incluyen hipertensión, hipercolesterolemia y tabaquismo. La fibrilación auricular o el infarto de miocardio reciente también son factores de riesgo importantes. Además, los niveles modificados de expresión de una molécula de ácido nucleico IL1RL-1, o un producto de expresión de los mismos, también son factores de riesgo importantes.

Como se usa en el presente documento, los sujetos que tienen un riesgo anormalmente elevado de accidente cerebrovascular isquémico también incluyen sujetos sometidos a procedimientos quirúrgicos o de diagnóstico que corren el riesgo de liberación de émbolos, disminución de la presión sanguínea o disminución del flujo sanguíneo al cerebro, como endarterectomía carotídea, angiografía cerebral, procedimientos de neurocirugía en los que los vasos sanguíneos están comprimidos u ocluidos, cateterismo cardíaco, angioplastia, incluida la angioplastia con balón, cirugía de derivación coronaria o procedimientos similares. Los sujetos que tienen un riesgo anormalmente elevado de accidente cerebrovascular isquémico también incluyen sujetos que tienen cualquier condición cardíaca que puede conducir a una disminución del flujo sanguíneo al cerebro, como fibrilación auricular, taquicardia ventricular, miocardiopatía dilatada y otras afecciones cardíacas que requieren anticoagulación. Los sujetos que tienen un riesgo anormalmente elevado de un accidente cerebrovascular isquémico también incluyen sujetos que tienen afecciones que incluyen arteriopatía o vasculitis cerebral, como la causada por lupus, enfermedades congénitas de los vasos sanguíneos, como el síndrome CADASIL o migraña, especialmente episodios prolongados.

El tratamiento del accidente cerebrovascular puede ser para pacientes que han sufrido un accidente cerebrovascular o pueden ser un tratamiento profiláctico. El tratamiento profiláctico a corto plazo está indicado para sujetos que tienen procedimientos quirúrgicos o diagnósticos que corren el riesgo de la liberación de émbolos, disminución de la presión arterial o disminución del flujo sanguíneo al cerebro, para reducir la lesión debido a cualquier evento isquémico que

- ocurre como consecuencia del procedimiento. El tratamiento profiláctico a largo plazo o crónico está indicado para sujetos que tienen afecciones cardíacas que pueden conducir a una disminución del flujo sanguíneo al cerebro o afecciones que afectan directamente a la vasculatura del cerebro. Si es profiláctico, entonces el tratamiento es para sujetos que tienen un riesgo anormalmente elevado de accidente cerebrovascular isquémico, como se describió anteriormente. Si el sujeto ha experimentado un accidente cerebrovascular, entonces el tratamiento puede incluir tratamiento agudo. El tratamiento agudo para sujetos con accidente cerebrovascular significa la administración de un agente de la divulgación al inicio de los síntomas del trastorno o dentro de las 48 horas del inicio, preferiblemente en 24 horas, más preferiblemente en 12 horas, más preferiblemente en 6 horas, y aún más preferiblemente dentro de las 3 horas de la aparición de los síntomas de la enfermedad.
- Los criterios para definir sujetos hipercolesterolémicos y/o hipertriglicéridémicos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, "Harrison's"). Los sujetos hipercolesterolémicos y los sujetos hipertriglicéridémicos se asocian con una mayor incidencia de enfermedad coronaria prematura. Un sujeto hipercolesterolémico tiene un nivel de LDL > 160 mg/dL o > 130 mg/dL y al menos dos factores de riesgo seleccionados del grupo que consiste en el sexo masculino, antecedentes familiares de enfermedad coronaria prematura, tabaquismo (más de 10 por día), hipertensión, bajo HDL (<35 mg/dL), diabetes mellitus, hiperinsulinemia, obesidad abdominal, lipoproteína alta (a) e historial personal de enfermedad cerebrovascular o enfermedad vascular periférica oclusiva. Un sujeto hipertriglicéridémico tiene un nivel de triglicéridos (TG) de > 250 mg/dL. Por lo tanto, un sujeto hiperlipidémico se define como uno cuyos niveles de colesterol y triglicéridos igualan o superan los límites establecidos como se describió anteriormente para los sujetos hipercolesterolémicos e hipertriglicéridémicos.
- El "infarto de miocardio" es un foco de necrosis resultante de perfusión inadecuada del tejido cardíaco. El infarto de miocardio generalmente se produce por una disminución brusca del flujo sanguíneo coronario al que sigue una oclusión trombótica de una arteria coronaria previamente estrechada por aterosclerosis. Generalmente, el infarto se produce cuando se fisura, se rompe o se ulcera una placa aterosclerótica y se forma un trombo mural lo que conduce a oclusión arterial coronaria.
- El diagnóstico de infarto de miocardio en un sujeto determina la necesidad de tratar al sujeto de acuerdo con los métodos de la divulgación. En Harrison, por ejemplo, se describen diversos ensayos de laboratorio, bien conocidos en la técnica. Generalmente, los ensayos pueden dividirse en cuatro categorías principales: (1) índices no específicos de necrosis e inflamación tisular (2) electrocardiogramas, (3) cambios enzimáticos en suero (por ejemplo, niveles de creatina fosfoquinasa) y (4) formación de imágenes cardíacas. Un experto habitual en el arte podrá aplicar fácilmente cualquiera de los ensayos anteriores para determinar cuándo un sujeto está en riesgo, padece o ha padecido un infarto de miocardio. Además, el aumento de los niveles de expresión de una molécula de ácido nucleico IL1RL-1, o un producto de expresión de los mismos, también son factores de riesgo importantes. Además, los niveles incrementados de expresión de una molécula de ácido nucleico de IL1RL-1, o un producto de expresión de los mismos, también son, de acuerdo con la presente divulgación, factores de riesgo importantes. Un sujeto identificado positivamente se beneficiaría así de un método de tratamiento de la divulgación. El método implica administrar a un sujeto que tiene un infarto de miocardio cualquiera de las moléculas de IL1RL-1 anteriores en una cantidad efectiva para tratar el trastorno cardiovascular en el sujeto. "Tener un infarto de miocardio" significa que el sujeto está en riesgo de desarrollarse, tiene actualmente o ha sufrido un infarto de miocardio. Se cree que la administración inmediata de la molécula beneficiaría en gran medida al sujeto al inhibir la muerte celular apoptótica de los cardiomiocitos (las células más afectadas por el infarto) antes o después del infarto. Por "inmediato" se entiende que la administración ocurre antes (si se diagnostica a tiempo), o dentro de las 48 horas posteriores al infarto de miocardio, aunque la administración hasta 14 días después del episodio también puede ser beneficiosa para el sujeto.
- Otra realización importante es el tratamiento de la lesión isquémica resultante de la arteriosclerosis. La arteriosclerosis es un término utilizado para describir un engrosamiento y endurecimiento de la pared arterial. Se cree que es responsable de la mayoría de las muertes en los Estados Unidos y en la mayoría de las sociedades occidentalizadas. La aterosclerosis es un tipo de arteriosclerosis que se cree que es la causa de la mayoría de las enfermedades de las arterias coronarias, el aneurisma aórtico y la enfermedad arterial de las extremidades inferiores (incluida la arteriopatía vascular periférica), además de contribuir a la enfermedad cerebrovascular. La aterosclerosis es la principal causa de muerte en los Estados Unidos.
- Una arteria normal típicamente está revestida en su lado interno únicamente por una sola capa de células endoteliales, la íntima. La íntima se superpone a los medios, que contienen un solo tipo de célula, la célula de músculo liso. La capa más externa de la arteria es la adventicia. Con el envejecimiento, hay un aumento continuo en el grosor de la íntima, que se cree que resulta en parte de la migración y la proliferación de las células musculares lisas de la media. También se produce un aumento similar en el grosor de la íntima como resultado de diversos eventos o intervenciones traumáticas, como ocurre cuando, por ejemplo, un procedimiento de dilatación con balón causa lesiones en la pared del vaso. La divulgación se usa en relación con el tratamiento de la lesión isquémica resultante de afecciones arterioscleróticas. Una afección arteriosclerótica como se usa en el presente documento significa aterosclerosis clásica, aterosclerosis acelerada, lesiones de aterosclerosis y cualquier otra afección arteriosclerótica caracterizada por proliferación indeseable de células de músculo liso endotelial y/o vascular, incluyendo complicaciones vasculares de diabetes.

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

5 Otra realización importante es el tratamiento de la hipertrofia cardíaca. Esta condición se caracteriza típicamente por hipertrofia ventricular izquierda, generalmente de una cámara no dilatada, sin causa previa obvia. Los métodos actuales de diagnóstico incluyen el electrocardiograma y el ecocardiograma. Sin embargo, muchos pacientes son asintomáticos y pueden ser familiares de pacientes con enfermedad conocida. Desafortunadamente, la primera manifestación de la enfermedad puede ser la muerte súbita, que ocurre con frecuencia en niños y adultos jóvenes, a menudo durante o
10 después de un esfuerzo físico.

Los agentes para reducir el riesgo o tratar un trastorno cardiovascular incluyen aquellos seleccionados del grupo que consiste en agentes antiinflamatorios, agentes antitrombóticos, agentes antiplaquetarios, agentes fibrinolíticos, agentes reductores de lípidos, inhibidores directos de la trombina, receptor de la glicoproteína IIb/IIIa inhibidores, agentes que se unen a moléculas de adhesión celular e inhiben la capacidad de los glóbulos blancos para unirse a tales moléculas (por ejemplo, anticuerpos de moléculas de adhesión celular), bloqueadores de los canales de calcio, bloqueadores de receptores beta-adrenérgicos, inhibidores de la ciclooxigenasa-2, inhibidores del sistema angiotensina, y/o cualquier combinación de los mismos. Un agente preferido es la aspirina.

El modo de administración y la dosificación de un agente terapéutico de la divulgación variarán según la etapa particular de la afección que se trata, la edad y el estado físico del sujeto que se está tratando, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si cualquiera), la vía de administración específica y factores similares dentro del conocimiento y experiencia del profesional de la salud.

Como se describe en este documento, los agentes de la divulgación se administran en cantidades efectivas para tratar cualquiera de los trastornos cardiovasculares anteriores. En general, una cantidad efectiva es cualquier cantidad que pueda causar un cambio beneficioso en un tejido deseado de un sujeto. Preferiblemente, una cantidad efectiva es la cantidad suficiente para provocar un cambio fenotípico favorable en una afección particular tal como una disminución, alivio o eliminación de un síntoma o de una afección en conjunto.

En general, una cantidad efectiva es aquella cantidad de una preparación farmacéutica que sola, o junto con dosis adicionales, produce la respuesta deseada. Esto puede implicar solo ralentizar la progresión de la condición temporalmente, aunque más preferiblemente, implica detener la progresión de la condición de forma permanente o retrasar el inicio o evitar que se produzca la afección. Esto puede ser monitoreado por métodos de rutina. En general, las dosis de los compuestos activos serían de aproximadamente 0,01 mg/kg por día a 1000 mg/kg por día. Se espera que sean adecuadas dosis que varían de 50 a 500 mg/kg, preferiblemente por vía oral y en una o varias administraciones por día.

Tales cantidades dependerán, por supuesto, de la afección particular que se trate, la gravedad de la afección, los parámetros del paciente sujeto, incluida la edad, condición física, tamaño y peso, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si corresponde), la vía de administración específica y factores similares dentro del conocimiento y la experiencia del profesional de la salud. Las dosis más bajas resultarán de ciertas formas de administración, como la administración intravenosa. En el caso de que una respuesta en un sujeto sea insuficiente en las dosis iniciales aplicadas, se pueden emplear dosis más altas (o dosis efectivamente más altas mediante una ruta de administración diferente, más localizada) en la medida en que lo permita la tolerancia del paciente. Se contemplan dosis múltiples por día para alcanzar niveles sistémicos apropiados de compuestos. En general, se prefiere que se use una dosis máxima, es decir, la dosis segura más alta de acuerdo con un criterio médico sólido. Los expertos en la técnica entenderán, sin embargo, que un paciente puede insistir en una dosis más baja o una dosis tolerable por razones médicas, razones psicológicas o virtualmente por cualquier otra razón.

Los agentes se pueden combinar, opcionalmente, con un vehículo farmacéuticamente aceptable para formar una preparación farmacéutica. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, significa uno o más agentes de relleno, diluyentes o sustancias de encapsulación sólidos o líquidos compatibles que son adecuados para la administración a un ser humano. El término "portador" denota un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también son capaces de mezclarse con las moléculas de la presente descripción y entre sí, de una manera tal que no haya interacción que perjudique sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada. En algunos aspectos, las preparaciones farmacéuticas comprenden un agente de la divulgación en una cantidad efectiva para tratar un trastorno.

Las preparaciones farmacéuticas pueden contener agentes reguladores adecuados, que incluyen: ácido acético en una sal; ácido cítrico en una sal; ácido bórico en una sal; o ácido fosfórico en una sal. Las composiciones farmacéuticas también pueden contener, opcionalmente, conservantes adecuados, tales como: cloruro de benzalconio; clorobutanol; parabenos o timerosal.

Una variedad de rutas de administración están disponibles. El modo particular seleccionado dependerá, por supuesto, del fármaco particular seleccionado, la gravedad de la afección que se está tratando y la dosificación requerida para la eficacia terapéutica. Los métodos de la descripción en términos generales, pueden ponerse en práctica usando cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable, es decir, cualquier modo que produzca niveles efectivos de los compuestos activos sin causar efectos adversos clínicamente inaceptables. Dichos modos de administración incluyen rutas oral, rectal, tópica, nasal, intradérmica, transdérmica o parenteral. El término "parenteral" incluye subcutáneo, intravenoso, intramuscular o infusión. Las vías intravenosa o intramuscular no son particularmente adecuadas para la terapia y la profilaxis a largo plazo. Como ejemplo, las composiciones farmacéuticas para el tratamiento agudo de sujetos que tienen cefalea migrañosa se pueden formular de una variedad de formas diferentes y para una variedad de modos de administración que incluyen tabletas, cápsulas, polvos, supositorios, inyecciones y aerosoles nasales.

Las preparaciones farmacéuticas se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de poner el agente activo en asociación con un vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el compuesto activo con un vehículo líquido, un vehículo sólido finamente dividido, o ambos, y luego, si es necesario, dando forma al producto.

Las composiciones adecuadas para administración oral se pueden presentar como unidades discretas, tales como cápsulas, tabletas, pastillas, cada una conteniendo una cantidad predeterminada del compuesto activo. Otras composiciones incluyen suspensiones en líquidos acuosos o líquidos no acuosos tales como un jarabe, elixir o una emulsión.

Las composiciones adecuadas para administración parenteral comprenden convenientemente una preparación acuosa estéril de un agente de la divulgación, que es preferiblemente isotónico con la sangre del receptor. Esta preparación acuosa se puede formular de acuerdo con métodos conocidos usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se encuentran el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como un disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite fijo blando incluyendo mono o di-glicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como el ácido oleico pueden usarse en la preparación de inyectables. Las formulaciones adecuadas para administraciones orales, subcutáneas, intravenosas, intramusculares, etc. se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA.

Otros sistemas de suministro pueden incluir sistemas de liberación con el tiempo, de liberación retardada o de liberación sostenida. Tales sistemas pueden evitar la administración repetida, aumentando la conveniencia para el sujeto y el médico. Muchos tipos de sistemas de liberación de liberación están disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica. Incluyen sistemas basados en polímeros tales como poli(láctido-glicólido), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, ácido polihidroxibutírico y polianhídridos. Las microcápsulas de los polímeros anteriores que contienen fármacos se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.075.109. Los sistemas de administración también incluyen sistemas que no son polímeros que son: lípidos que incluyen esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono-, di- y tri-glicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas *sylastic*; sistemas basados en péptidos; recubrimientos de cera; tabletas comprimidas que usan aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a: (a) sistemas erosivos en los que un agente de la divulgación está contenido en una forma dentro de una matriz tal como las descritas en las patentes de Estados Unidos números 4.452.775; 4.675.189; y 5,736,152; y (b) sistemas difusionales en los que un componente activo se impregna a una tasa controlada de un polímero tal como se describe en las patentes U.S. Nos. 3.854.480; 5.133.974; y 5.407.686. Además, se pueden usar sistemas de suministro de hardware basados en bombas, algunos de los cuales están adaptados para la implantación.

El uso de un implante de liberación prolongada a largo plazo puede ser deseable. La liberación a largo plazo, como se usa en este documento, significa que el implante está construido y dispuesto para administrar niveles terapéuticos del ingrediente activo durante al menos 30 días, y preferiblemente 60 días. Los implantes de liberación sostenida a largo plazo son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen algunos de los sistemas de liberación descritos anteriormente. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a, implantes de liberación sostenida a largo plazo descritos en la patente de los Estados Unidos N° 4.748.024 y la patente canadiense No. 1330939.

La divulgación también implica la administración, y en algunas realizaciones, la administración conjunta de agentes distintos de las moléculas de IL1RL-1 (ácidos nucleicos y polipéptidos, y/o fragmentos de los mismos) que cuando se administran en cantidades efectivas pueden actuar de forma cooperativa, aditiva o sinérgica con una molécula de la divulgación para: (i) modular la actividad antiapoptótica de las células cardíacas, y (ii) tratar cualquiera de las afecciones en las que está implicada la actividad antiapoptótica de las células cardíacas de una molécula de la divulgación. Los agentes distintos de las moléculas de la divulgación incluyen agentes antiinflamatorios, agentes antitrombóticos, anticoagulantes, agentes antiplaquetarios, agentes fibrinolíticos, agentes reductores de lípidos, inhibidores directos de la trombina, inhibidores del receptor de la glicoproteína IIb/IIIa, agentes que se unen a moléculas de adhesión celular e

inhiben la capacidad de los glóbulos blancos para unirse a tales moléculas, bloqueadores de los canales de calcio, bloqueadores de los receptores beta-adrenérgicos, inhibidores de la ciclooxigenasa-2, inhibidores del sistema angiotensina, agentes antihipertensivos y/o combinaciones de los mismos.

5 Los agentes "antiinflamatorios" incluyen alclofenaco; alclometasona dipropionato; algestona acetónido; alfa-amilasa; amcinafal; amcinafida; amfenaco sódico; amiprilosa clorhidrato; anakinra; aniolac; anitrazafen; apazona; balsalazida disódico; bendazac; benoxaprofeno; bencidamina clorhidrato; bromelains; broperamola; budesonida; carprofeno; cicloprofeno; cintazona; cliprofeno; propionato de clobetasol; butirato de clobetasona; clopirac; cloticasona propionato; cormetasona acetato; cortodoxona; deflazacort; desonide; desoximetasona; dexametasona dipropionato; diclofenaco potasio; diclofenaco sódico; diflorasona diacetato; diflumidona de sodio; diflunisal; difluprednato; diflazona; 10 dimetilsulfóxido; drocinonida; endrisona; enlimomab; enolicam de sodio; epirizol; etodolaco; etofenamato; felbinaco; fenamole; fenbufen; fenclofenaco; fenclorac; fendosal; fempipalona; fentiazaco; flazalona; fluazacort; ácido flufenámico; flumizol; acetato de flunisolida; flunixinina; flunixinina meglumina; fluocortina butilo; acetato de fluorometolona; fluquazona; flurbiprofeno; fluretifen; propionato de fluticasona; furaprofen; furobufen; halcinonida; halobetasol propionato; acetato de halopredona; ibufenaco; ibuprofeno; ibuprofeno aluminio; ibuprofeno piconol; ilonidap; indometacina; indometacina 15 sódica; indoprofeno; indoxol; intrazol; acetato de isoflupredona; isoxepaco; isoxicam; ketoprofeno; lofemizole clorhidrato; lomoxicam; etabonato de loteprednol; meclofenamato sódico; ácido meclofenámico; meclorisone dibutirato; ácido mefenámico; mesalamina; meseclazona; metilprednisolona suleptanato; momiflumato; nabumetona; naproxeno; naproxeno sódico; naproxol; nimazona; sodio olsalazina; orgotein; orpanoxin; oxaprozina; oxifenbutazona; paranyline clorhidrato; pentosano polisulfato de sodio; fenbutazona glicerato de sodio; pifenidona; piroxicam; piroxicam cinamato; 20 piroxicam olamina; piroprofeno; prednazato; prifelona; ácido prodolico; procuazona; proxazol; citrato de proxazol; rimexolona; romazarit; salcolex; salnacedin; salsalato; salicilatos; sanguinarium cloruro; seclazona; sermetacina; sudoxicam; sulindac; suprofen; talmetacina; talniflumato; talosalato; tebufelona; tenidap; tenidap sódico; tenoxicam; tescam; tesimida; tetridamina; tiopinaco; pivalato de tixocortol; tolmetina; tolmetina de sodio; triclonida; triflumidato; zidometacina; glucocorticoides; y zomepirac sódico. Un agente antiinflamatorio preferido es la aspirina.

25 Agentes "anti-trombótico" y/o "fibrinolítico" incluyen plasminógeno (plasmina a través de interacciones de precalicreína, quinínógenos, Factores XII, XIIIa, proactivador de plasminógeno y activador del plasminógeno tisular [TPA]) estreptoquinasa; uroquinasa: anisoilado; complejo activador de plasminógeno-estreptoquinasa; Pro-uroquinasa; (Pro-UK); rTPA (alteplasa o activasa; "r" denota recombinante); rPro-UK; Abbokinase; eminas; clorhidrato de Sreptase Anagrelide; bivalirudina; dalteparina sódica; danaparoide sódico; dazoxiben clorhidrato; efegatran sulfato; enoxaparina 30 sódica; ifetroban; ifetroban sódico; tinzaparin de sodio; retaplase; trifenagrel; warfarina; y dextranos.

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

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

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

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

40 "Bloqueadores de los canales de calcio" son una clase químicamente diferente de compuestos que tienen un importante valor terapéutico en el control de una variedad de enfermedades incluyendo varios trastornos cardiovasculares, tales como hipertensión, angina de pecho, y arritmias cardíacas (Fleckenstein, Cir. Res. v. 52, (suppl. 1), p.13-16 (1983); Fleckenstein, Experimental Facts and Therapeutic Prospects, John Wiley, New York (1983); McCall, D., Curr Pract Cardiol, v. 10, p. 1-11 (1985)). Los bloqueadores de los canales de calcio son un grupo heterogéneo de fármacos que previenen o retardan la entrada de calcio en las células mediante la regulación de los canales de calcio celulares. 45 (Remington, The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Edition, Mack Publishing Company, Eaton, PA, p.963 (1995)). La mayoría de los bloqueadores de los canales de calcio actualmente disponibles, pertenecen a uno de los tres principales grupos químicos de los fármacos, las dihidropiridinas tales como nifedipino, las aminas de fenil alquilo, tales como verapamilo, y las benzotiazepinas, tales como diltiazem. Otros bloqueadores de los canales de calcio incluyen, pero no se limitan a, amrinona, amlodipino, benciclano, felodipino, fendilina, flunarizina, isradipino, nicardipino, nimodipino, perhexileno, galopamil, tiapamil y análogos de tiapamil (como 1993RO-11 -2933), fenitoína, barbitúricos y 50 los péptidos dinorfina, omega-conotoxina, y omega-agatoxina, y similares, y/o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

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

tbutilaminopropoxi) ftalida. Los compuestos identificados anteriormente se pueden utilizar como mezclas de isómeros, o en sus respectivas forma levógira o dextrógira.

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

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

Una serie de "inhibidores de la COX-2" selectivos son conocidos en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a, inhibidores COX-2 descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 5,474,995 "Phenyl heterocycles as COX-2 inhibitors"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,521,213 "Diaryl bicyclic heterocycles as inhibitors of cyclooxygenase-2"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,536,752 "Phenyl heterocycles as COX-2 inhibitors"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,550,142 "Phenyl heterocycles as COX-2 inhibitors"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,552,422 "Aryl substituted 5,5 fused aromatic nitrogen compounds as anti-inflammatory agents"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,604,253 "N-Benzylindol-3-yl propanoic acid derivatives as ciclooxigenase inhibitors"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,604,260 "5-Methanesulfonamido-1-indanones as an inhibitor of cyclooxygenase-2"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,639,780 N-Benzyl indol-3-yl butanoic acid derivatives as cyclooxygenase inhibitors"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,677,318 Diphenyl-1,2-3-thiadiazoles as anti-inflammatory agents"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,691,374 "Diaryl-5-oxygenated-2-(5H)-furanones as COX-2 inhibitors"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,698,584 "3,4-Diaryl-2-hydroxy-2,5-dihydrofurans as prodrugs to COX-2 inhibitors"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,710,140 "Phenyl heterocycles as COX-2 inhibitors"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,733,909 "Diphenyl stilbenes as prodrugs to COX-2 inhibitors"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,789,413 "Alkylated styrenes as prodrugs to COX-2 inhibitors"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,817,700 "Bisaryl cyclobutenes derivatives as cyclooxygenase inhibitors"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,849,943 "Stilbene derivatives useful as cyclooxygenase-2 inhibitors"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,861,419 "Substituted pyridines as selective cyclooxygenase-2 inhibitors"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,922,742 "Pyridinyl-2-cyclopenten-1-ones as selective cyclooxygenase-2 inhibitors"; la Patente de los Estados Unidos No. 5,925,631 "Alkylated styrenes as prodrugs to COX-2 inhibitors"; all of which are commonly asignada a Merck Frosst Canada, Inc. (Kirkland, CA o Merck & Co., Inc. (Rahway, NJ). También se describen inhibidores de COX-2 adicionales en la Patente de los Estados Unidos No. 5,643,933, asignada a G. D. Searle & Co. (Skokie, IL), titulada: "Substituted sulfonylphenylheterocycles as cyclooxygenase-2 y 5-lipoxygenase inhibitors."

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

Un "inhibidor del sistema de angiotensina" es un agente que interfiere con la función, la síntesis o catabolismo de la angiotensina II. Estos agentes incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), antagonistas de la angiotensina II, antagonistas del receptor de la angiotensina II, agentes que activan el

catabolismo de la angiotensina II, y agentes que impiden la síntesis de la angiotensina I de la que la angiotensina II se deriva en última instancia. El sistema renina-angiotensina está implicado en la regulación de la hemodinámica y el equilibrio hidroelectrolítico. Los factores que disminuyen el volumen de sangre, presión de perfusión renal o la concentración de Na⁺ en el plasma tienden a activar el sistema, mientras que los factores que aumentan estos parámetros tienden a suprimir su función.

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

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

Los "antagonistas de la angiotensina II" son compuestos que interfieren con la actividad de la angiotensina II mediante la unión a receptores de la angiotensina II y que interfieren con su actividad. Los antagonistas de angiotensina II son bien conocidos e incluyen compuestos peptídicos y compuestos no peptídicos. La mayoría de los antagonistas de la angiotensina II son congéneres modificados ligeramente en el que la actividad agonista es atenuada por la sustitución de fenilalanina en la posición 8 con algún otro aminoácido; la estabilidad se puede mejorar por otros reemplazos que la degeneración lenta *in vivo*. Los ejemplos de antagonistas de angiotensina II incluyen: compuestos peptídicos (por ejemplo, saralasin, [(San¹)(Val⁵)(Ala⁸)] angiotensina-(1-8) octapéptido y análogos relacionados); imidazol-2-ona N-sustituidos (la Patente de los Estados Unidos No. 5,087,634); derivados de acetato de imidazol, incluyendo 2-N-butil-4-cloro-1- (2-clorobencilo), ácido imidazol-5-acético (véase Long et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 247(1), 1-7 (1988)); ácido 4, 5, 6, 7-tetrahydro-1Himidazo [4, 5-c] piridina-6-carboxílico y derivados análogos (Patente de los Estados Unidos No. 4,816,463); análogos N2-tetrazol beta-glucuronida (Patente de los Estados Unidos No. 5,085,992); sustituidos pirroles, pirazoles, y triazoles (Patente de los Estados Unidos No. 5,081,127); derivados de fenol y heterocíclicos, tales como 1, 3-imidazoles (Patente de los Estados Unidos No. 5,073,566); heterociclos de anillos de 7 miembros imidazo fusionados (Patente de los Estados Unidos No. 5,064,825); péptidos (por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4,772,684); anticuerpos contra la angiotensina II (por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 4,302,386); y compuestos de imidazolo aralquilo tales como imidazoles bifenilo-metilo sustituidos (por ejemplo, EP Número 253,310, 20 de enero de 1988); ES8891 (N-morfolinoacetil- (- 1-naftil) -L-alanil (4, tiazolil) -L-alanil (35, 45)- 4-amino-3-hidroxi-5-ciclohexapentanoil-N-hexilamida, Sankyo Company, Ltd., Tokio, Japón); SKF108566 (ácido E-alfa-2- [2-butil-1- (carboxifenil) metil] 1H-imidazol-5-il [metilano] -2-tiofenopropanoico, Smith Kline Beecham Pharmaceuticals, PA); Losartán (DUP753/MK954, DuPont Merck Pharmaceutical Company); Remikirin (RO42-5892, F. Hoffman LaRoche AG); agonistas A2 (Marion Merrill Dow) y ciertos heterociclos no peptídicos (G.D.Searle and Company).

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

Los "inhibidores de la renina" son compuestos que interfieren con la actividad de la renina. Los inhibidores de la renina incluyen aminoácidos y derivados de los mismos, péptidos y derivados de los mismos, y anticuerpos para la renina. Ejemplos de inhibidores de renina que son el tema de las Patentes de los Estados Unidos son los siguientes: derivados de urea de péptidos (Patente de los Estados Unidos No. 5,116,835); aminoácidos conectados por enlaces no peptídicos (Patente de los Estados Unidos No. 5,114,937); derivados de di- y tri-péptidos (Patente de los Estados Unidos No. 5,106,835); aminoácidos y derivados de los mismos (Patente de los Estados Unidos Nos. 5,104,869 y 5,095,119); diol sulfonamidas y sulfínilos (Patente de los Estados Unidos No. 5,098,924); péptidos modificados (Patente de los Estados

- Unidos No. 5,095,006); carbamatos aminodiol beta-aminoacil peptidilo (Patente de los Estados Unidos No. 5,089,471); pirolimidazolonas (Patente de los Estados Unidos No. 5,075,451); péptidos que contienen estatina de flúor y de cloro o estatona (Patente de los Estados Unidos No. 5,066,643); peptidil amino dioles (Patente de los Estados Unidos Nos. 5,063,208 y 4,845,079); (Patente de los Estados Unidos No. 5,066,643); peptidílicos amino dioles (Patente de los Estados Unidos N° 5.063.208 y 4.845.079.); derivados de N-morfolino (Patente de los Estados Unidos No. 5,055,466); derivados de pepstatina (Patente de los Estados Unidos No. 4,980,283); alcoholes N-heterocíclicos (Patente de los Estados Unidos No. 4,885,292); anticuerpos monoclonales para renina (Patente de los Estados Unidos No. 4,780,401); y una variedad de otros péptidos y análogos de los mismos (Patente de los Estados Unidos Nos. 5,071,837, 5,064,965, 5,063,207, 5,036,054, 5,036,053, 5,034,512, y 4,894,437).
- Los agentes que se unen a moléculas de adhesión celular e inhiben la capacidad de los leucocitos para unir a tales moléculas incluyen agentes de polipéptidos. Tales polipéptidos incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales, preparados de acuerdo con la metodología convencional. Tales anticuerpos son ya conocidos en la técnica e incluyen anticuerpos anti-ICAM 1, así como otros tales anticuerpos descritos anteriormente.
- Los agentes anticoagulantes incluyen, pero no se limitan a, Ancrod; solución anticoagulante de citrato dextrosa; solución anticoagulante de citrato fosfato adenina dextrosa; solución anticoagulante de dextrosa citrato fosfato; solución anticoagulante de heparina; solución anticoagulante de citrato de sodio; ardeparina de sodio; bivalirudina; bromindiona; dalteparina sódica; desirudina; dicumarol; heparina de calcio; heparina de sodio; liapolato de sodio; nafamostat mesilato; fenprocumon; tinzaparin de sodio; y warfarina sódica.
- La heparina puede estabilizar los síntomas en la evolución de accidente cerebrovascular, pero los anticoagulantes son inútiles (y posiblemente peligrosos) en el accidente cerebrovascular agudo, y están contraindicados en los pacientes hipertensos debido a la mayor posibilidad de hemorragia en el cerebro u otros órganos. A pesar de que el tiempo es objeto de controversia, los anticoagulantes pueden comenzar a prevenir la embolia recurrente cardiogénica. Agentes de lisis de coágulos, incluyendo el activador de plasminógeno de tejido y estreptoquinasa, se están evaluando para el tratamiento muy temprano del accidente cerebrovascular agudo. Recientemente se ha demostrado que nimodipino mejora la supervivencia y el resultado clínico después del accidente cerebrovascular isquémico.
- Aparte de la aspirina, se ha demostrado que la ticlopidina es otro agente antiplaquetario beneficioso para el tratamiento del accidente cerebrovascular. Endarterectomía puede estar indicado en pacientes con un 70 a 99 por ciento estrechamiento de una arteria carótida interna sintomática. Sin embargo, la mayoría de las autoridades coinciden en que la endarterectomía carotídea no está indicada en pacientes con AIT que son atribuibles al sistema basilar vertebral, en pacientes con un déficit significativo de accidentes cerebrovasculares previos, o en pacientes en los que un accidente cerebrovascular está evolucionando.
- HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A) reductasa es la enzima microsomal que cataliza la reacción limitante de la velocidad en la biosíntesis de colesterol (HMG-CoA6Mevalonato). Un inhibidor de la HMG-CoA inhibe la HMG-CoA reductasa, y como resultado inhibe la síntesis de colesterol. Un número de inhibidores de la HMG-CoA reductasa se ha utilizado para tratar sujetos con hipercolesterolemia. Más recientemente, inhibidores de la HMG-CoA reductasa han demostrado ser beneficiosos en el tratamiento de accidente cerebrovascular (Endres M, et al, Proc Natl Acad Sci EE.UU., 1998,95: 8880-5).
- Los inhibidores de HMG-CoA reductasa útiles para coadministración con los agentes de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, simvastatina (Patente de los Estados Unidos No. 4,444,784); lovastatina (Patente de los Estados Unidos No. 4,231,938); pravastatina sódica (Patente de los Estados Unidos No. 4,346,227); fluvastatina (Patente de los Estados Unidos No. 4,739,073); atorvastatina (Patente de los Estados Unidos No. 5,273,995); cerivastatina, y numerosas otras descritas en la Patente de los Estados Unidos No. 5,622,985; la Patente de los Estados Unidos No. 5,135,935; la Patente de los Estados Unidos No. 5,356,896; la Patente de los Estados Unidos No. 4,920,109; la Patente de los Estados Unidos No. 5,286,895; la Patente de los Estados Unidos No. 5,262,435; la Patente de los Estados Unidos No. 5,260,332; la Patente de los Estados Unidos No. 5,317,031; la Patente de los Estados Unidos No. 5,283,256; la Patente de los Estados Unidos No. 5,256,689; la Patente de los Estados Unidos No. 5,182,298; la Patente de los Estados Unidos No. 5,369,125; la Patente de los Estados Unidos No. 5,302,604; la Patente de los Estados Unidos No. 5,166,171; la Patente de los Estados Unidos No. 5,202,327; la Patente de los Estados Unidos No. 5,276,021; la Patente de los Estados Unidos No. 5,196,440, la Patente de los Estados Unidos No. 5,091,386; la Patente de los Estados Unidos No. 5,091,378; la Patente de los Estados Unidos No. 4,904,646; la Patente de los Estados Unidos No. 5,385,932; la Patente de los Estados Unidos No. 5,250,435; la Patente de los Estados Unidos No. 5,132,312; la Patente de los Estados Unidos No. 5,130,306; la Patente de los Estados Unidos No. 5,116,870; la Patente de los Estados Unidos No. 5,112,857; la Patente de los Estados Unidos No. 5,102,911; la Patente de los Estados Unidos No. 5,098,931; la Patente de los Estados Unidos No. 5,081,136; la Patente de los Estados Unidos No. 5,025,000; la Patente de los Estados Unidos No. 5,021,453; la Patente de los Estados Unidos No. 5,017,716; la Patente de los Estados Unidos No. 5,001,144; la Patente de los Estados Unidos No. 5,001,128; la Patente de los Estados Unidos No. 4,997,837; la Patente de los Estados Unidos No. 4,996,234; la Patente de los Estados Unidos No. 4,994,494; la Patente de los Estados Unidos No. 4,992,429; la Patente de los Estados Unidos No. 4,970,231; la Patente de los Estados Unidos No. 4,968,693; la Patente de los Estados Unidos No. 4,963,538; la Patente de los Estados Unidos No. 4,957,940; la Patente de los Estados Unidos No. 4,950,675; la Patente de los Estados Unidos No. 4,946,864; la Patente de los Estados Unidos No. 4,946,860; la Patente de los Estados Unidos No. 4,940,800; la Patente de los Estados

Unidos No. 4,940,727; la Patente de los Estados Unidos No. 4,939,143; la Patente de los Estados Unidos No. 4,929,620; la Patente de los Estados Unidos No. 4,923,861; la Patente de los Estados Unidos No. 4,906,657; la Patente de los Estados Unidos No. 4,906,624; y la Patente de los Estados Unidos No. 4,897,402.

5 El óxido nítrico (NO) ha sido reconocido como una molécula mensajera con muchas funciones fisiológicas, en los sistemas cardiovascular, neurológico e inmunológico (Griffith, TM et al., J Am Coll Cardiol, 1988, 12:797-806). Este media la relajación de los vasos sanguíneos, la neurotransmisión y supresión de patógenos. El NO es producido a partir del nitrógeno guanidino de L-arginina por la NO sintasa (Moncada, S and Higgs, EA, Eur J Clin Invest, 1991, 21: 361-374). Los agentes que regulan positivamente óxido nítrico sintasa de las células endoteliales incluyen, pero no se limitan a, L-arginina, inhibidores de la función rho GTPasa (véase la Solicitud Internacional WO 99/47153, cuya descripción se incorpora en este documento por referencia), y los agentes que interrumpen citoesqueleto de actina organización (véase la Solicitud Internacional WO 00/03746). La "coadministración", como se usa en el presente documento, se refiere a administrar simultáneamente dos o más compuestos de la divulgación (por ejemplo, un ácido nucleico y/o polipéptido IL1RL-1, y un agente que se sabe que es beneficioso en el tratamiento de, por ejemplo, una afección cardiovascular, por ejemplo, un anticoagulante), como una mezcla en una sola composición, o secuencialmente, lo suficientemente cerca en el tiempo para que los compuestos puedan ejercer un efecto aditivo o incluso sinérgico, es decir, al reducir la muerte celular por cardiomiocitos en una condición cardiovascular.

20 La divulgación también abarca matrices de moléculas de ácido nucleico en fase sólida. La matriz consiste esencialmente en un conjunto de moléculas de ácido nucleico, productos de expresión de las mismas o fragmentos (del ácido nucleico o la molécula polipeptídica) del mismo, el conjunto que incluye una molécula de ácido nucleico IL1RL-1 y al menos una molécula de ácido nucleico de control fija a un sustrato sólido. En realizaciones preferidas, el conjunto de moléculas de ácido nucleico comprende un número máximo de 100 moléculas de ácido nucleico diferentes. En realizaciones importantes, el conjunto de moléculas de ácido nucleico comprende un número máximo de 10 moléculas de ácido nucleico diferentes. Las técnicas de hibridación estándar de la tecnología de micromatrices se utilizan para evaluar patrones de expresión de ácidos nucleicos e identificar la expresión de ácidos nucleicos. La tecnología de micromatrices, que también se conoce con otros nombres, que incluyen tecnología de chips de ADN, tecnología de chips de genes y tecnología de matriz de ácidos nucleicos en fase sólida, es bien conocida por los expertos en la técnica y se basa, entre otros, en: obtener una matriz de sondas de ácido nucleico identificadas (por ejemplo, moléculas descritas en otra parte de la presente memoria tales como IL1RL-1) en un sustrato fijo, marcar moléculas diana con moléculas indicadoras (por ejemplo, etiquetas radioactivas, quimioluminiscentes o fluorescentes tales como fluoresceína, Cy3-dUTP, o Cy5-dUTP), hibridando ácidos nucleicos diana con las sondas, y evaluando la hibridación diana-sonda. Una sonda con una secuencia de ácidos nucleicos que se adapta perfectamente a la secuencia diana, en general, dará como resultado la detección de una señal de molécula indicadora más fuerte que las sondas con coincidencias menos perfectas. Muchos componentes y técnicas utilizadas en la tecnología de micromatrices de ácidos nucleicos se presentan en Nature Genetics, Vol.21, enero de 1999. De acuerdo con la presente divulgación, los sustratos de micromatrices pueden incluir, pero sin limitación, vidrio, sílica, aluminosilicatos, borosilicatos, óxidos metálicos tales como alúmina y óxido de níquel, diversas arcillas, nitrocelulosa o nailon. En todas las realizaciones, se prefiere un sustrato de vidrio. Las sondas se seleccionan del grupo de ácidos nucleicos que incluyen, pero no se limitan a: ADN, ADN genómico, ADNc y oligonucleótidos; y puede ser natural o sintético. Las sondas de oligonucleótidos preferiblemente son oligonucleótidos de 20 a 25 mer y las sondas de ADN/ADNc tienen preferiblemente una longitud de 500 a 5000 bases, aunque pueden usarse otras longitudes. La longitud de la sonda apropiada puede ser determinada por un experto en la técnica siguiendo procedimientos conocidos en la técnica. En una realización, las sondas preferidas son conjuntos de dos o más de las moléculas de ácido nucleico expuestas como SEQ ID NOS: 1 y/o 3. Las sondas pueden purificarse para eliminar contaminantes usando métodos estándar conocidos por los expertos en la técnica tales como filtración o precipitación en gel.

45 En una realización, el sustrato de micromatrices puede recubrirse con un compuesto para mejorar la síntesis de la sonda sobre el sustrato. Tales compuestos incluyen, pero no se limitan a, oligoetilenglicoles. En otra realización, los agentes de acoplamiento o grupos en el sustrato se pueden usar para unir covalentemente el primer nucleótido u oligonucleótido al sustrato. Estos agentes o grupos pueden incluir, pero sin limitación: grupos amino, hidroxilo, bromo y carboxi. Estos grupos reactivos se unen preferiblemente al sustrato a través de un radical hidrocarbilo tal como un radical divalente de alquileo o fenileno, una posición de valencia ocupada por la unión de cadena y la restante unida a los grupos reactivos. Estos grupos hidrocarbilo pueden contener hasta aproximadamente diez átomos de carbono, preferiblemente hasta aproximadamente seis átomos de carbono. Los radicales alquileo son generalmente preferidos que contienen de dos a cuatro átomos de carbono en la cadena principal. Estos y detalles adicionales del proceso se describen, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos N° 4.458.066. En una realización, las sondas se sintetizan directamente sobre el sustrato en un patrón de cuadrícula predeterminado usando métodos tales como síntesis química dirigida a la luz, desprotección fotoquímica, o suministro de precursores de nucleótidos al sustrato y posterior producción de sonda.

60 En otra realización, el sustrato se puede recubrir con un compuesto para mejorar la unión de la sonda al sustrato. Tales compuestos incluyen, entre otros: polilisina, amino silanos, silanos aminoactivos (Nature Genetics, Vol.21, Jan 1999) o cromo. En esta realización, las sondas presintetizadas se aplican al sustrato en un patrón preciso de volumen y cuadrícula, utilizando un robot controlado por computadora para aplicar la sonda al sustrato de manera de contacto o sin

contacto, tal como un chorro de tinta, o entrega piezoeléctrica. Las sondas se pueden unir covalentemente al sustrato con métodos que incluyen, pero no se limitan a, irradiación UV y calor.

Las dianas son ácidos nucleicos seleccionados del grupo, que incluyen, pero no se limitan a, ADN, ADN genómico, ADNc, ARN, ARNm y pueden ser naturales o sintéticos. En todas las realizaciones, se prefieren moléculas de ácido nucleico de sujetos con sospecha de desarrollar o tener una afección cardiovascular. En ciertas realizaciones, una o más moléculas de ácido nucleico de control están unidas al sustrato. Preferiblemente, las moléculas de ácido nucleico de control permiten la determinación de factores que incluyen, pero no se limitan a: la calidad del ácido nucleico y las características de unión; calidad y efectividad del reactivo; éxito de la hibridación; y umbrales de análisis y éxito. Los ácidos nucleicos de control pueden incluir, pero sin limitación, productos de expresión de genes tales como genes de mantenimiento o fragmentos de los mismos.

Para seleccionar un conjunto de marcadores de enfermedad cardiovascular, los datos de expresión generados, por ejemplo, análisis de micromatrices de expresión génica, se analizan preferiblemente para determinar qué genes en diferentes categorías de pacientes (cada categoría de pacientes es un trastorno cardiovascular diferente), son significativamente expresados diferencialmente. La importancia de la expresión génica se puede determinar usando el software informático Permax, aunque se puede usar cualquier paquete estadístico estándar que pueda discriminar diferencias significativas. Permax realiza pruebas t de permutación de 2 muestras en grandes conjuntos de datos. Para vectores de observaciones de alta dimensión, el software Permax calcula t-statistics para cada atributo y evalúa la significancia usando la distribución de permutación de los atributos máximos y mínimos generales. El uso principal es determinar los atributos (genes) que son los más diferentes entre dos grupos (por ejemplo, control del sujeto sano y un sujeto con un desorden cardiovascular particular), midiendo "más diferentes" usando el valor de las estadísticas t, y sus niveles de significancia.

La expresión de moléculas de ácido nucleico de enfermedad cardiovascular también se puede determinar utilizando métodos de medición de proteína para determinar la expresión de SEQ ID NOs: 2 y/o 4, por ejemplo, determinando la expresión de polipéptidos codificados por SEQ ID NOs: 1 y/o 3, respectivamente. Los métodos preferidos para medir proteínas de forma específica y cuantitativa incluyen, pero no se limitan a: métodos basados en espectroscopía de masas tales como ionización por desorción láser mejorada en superficie (SELDI, por ejemplo, Ciphergen ProteinChip System), métodos basados en espectroscopía no masa, y métodos basados en inmunohistoquímica tales como electroforesis en gel bidimensional.

La metodología SELDI puede, a través de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, usarse para vaporizar cantidades microscópicas de proteína tumoral y para crear una "huella digital" de proteínas individuales, permitiendo así la medición simultánea de la abundancia de muchas proteínas en una sola muestra. Preferiblemente, los ensayos basados en SELDI se pueden utilizar para caracterizar las afecciones cardiovasculares así como las etapas de tales condiciones. Tales ensayos incluyen preferiblemente, pero no se limitan a los siguientes ejemplos. Los productos génicos descubiertos mediante micromatrices de ARN se pueden medir selectivamente mediante captura específica (mediada por anticuerpos) en el disco de proteína SELDI (por ejemplo, SELDI selectivo). Los productos genéticos descubiertos mediante detección de proteínas (por ejemplo, con geles 2-D) pueden resolverse mediante "SELDI de proteína total" optimizado para visualizar los marcadores particulares de interés de las SEQ ID NOs: 1 y/o 3. Modelos predictivos de clasificación de tumores a partir de la medición de SELDI de múltiples marcadores de las SEQ ID NOs: 1 y/o 3, pueden utilizarse para las estrategias de SELDI.

El uso de cualquiera de los métodos de micromatrices anteriores para determinar la expresión de ácidos nucleicos de enfermedades cardiovasculares puede realizarse con métodos rutinarios conocidos por los expertos en la técnica y la expresión determinada por métodos de medición de proteínas puede correlacionarse con niveles predeterminados de un marcador usado como un método de pronóstico para seleccionar estrategias de tratamiento para pacientes con enfermedad cardiovascular.

Ejemplos

Ejemplo 1.

Protocolos experimentales: Materiales y Métodos

Dispositivo de tensión mecánica

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

El dispositivo de tensión - estimulación. La estrategia para la estimulación mecánica usó un aparato que tiene platinas múltiples que contactan con la parte inferior de membranas elastoméricas de silicona para aplicar un perfil de tensión

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

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

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

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

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

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

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

40 Análisis de Northern. Usando secuencias del GenBank, se obtuvieron clones de ADNc para genes expresados diferencialmente mediante PCR. Cada clon se secuenció a partir de ambos extremos 5' y 3' para confirmar la identidad. Los elementos positivos en la micromatriz de ADN se confirmaron por análisis de hibridación por transferencia de Northern en al menos tres experimentos independientes usando tres fuentes diferentes de MVRN. Se aisló ARN total

mediante el procedimiento tiocianato de guanidina y fenol cloroformo (Chomczynski, et al., Anal. Biochem., 1987, 162:156-159). Para la transferencia de Northern, se cargaron 15 µg de ARN en un gel de agarosaformaldehído al 1.0% (2.0 mol/L), se transfirió a una membrana de nailon (Amersham Pharmacia Biotech AB, Piscataway, NJ) y se entrecruzó con UV con un Stratalinker UV (Stratagene, Inc., La Jolla, CA). Cada sonda se hibridó con solución ExpressHyb (Clontech Labs., Inc., Palo Alto, CA) a 68 °C, durante 1 hora. La membrana se lavó con 2 x SSC, solución de SDS al 0.05% durante 30 a 40 minutos y tres veces a temperatura ambiente y 0.1 x SSC, solución de SDS al 0.1% con agitación continua a 50 °C durante 40 minutos. La membrana se expuso a una película a -80 °C y se escanearon radiografías y se analizaron con el programa informático Optimas 5.0 (Optimas Co./Media Cybernetics, Silver Springs, MD). Se normalizaron unidades densitométricas con respecto a la subunidad ribosómica de 28S teñida con etidio en la membrana.

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

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

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

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

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

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

Ejemplo 2.

45 Introducción:

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

La señalización de la interleucina-1 mediante el receptor de interleucina-1 es un acontecimiento precoz en la señalización de citocina inflamatoria en muchos sistemas diferentes (Trehu EG., Clin Cancer Res. 1996; 8: 1341-51). En lesión cardiaca, la interleucina-6 se produce por miocitos cardiacos secundario a estimulación con interleucina-1, factor α de necrosis tumoral o lipopolisacáridos y se ha detectado en el sistema linfático después de isquemia durante 5
reperfusión de miocardio isquémico (Gwechenberger M, et al. Circulation 1999;99:546-551). Hace poco se ha reconocido la posible expresión de citocinas antiinflamatorias que contrarrestan de manera secundaria la enfermedad cardiaca frente a la señalización de interleucina-1. La interleucina-1 y la interleucina-10 pueden suprimir la síntesis del factor α de necrosis tumoral y potenciar liberación de receptores del factor de necrosis tumoral soluble, que son ligandos drenaje para el factor de necrosis tumoral (Joyce DA., 1994; Eur. J. Immunol. 11:2699-705). La interleucina-10 está 10
aumentada en pacientes con insuficiencia cardiaca (Yamaoka M, et al. Jpn Circ J. 1999;63:951-956) y en pacientes con cardiomiopatía dilatada, los niveles en suero de la interleucina-10 están aumentados cuando aumentan los niveles en suero del factor α de necrosis tumoral (Ohtsuka T, et al. J Am Coll Cardiol. 2001;37:412-417).

T1/ST2 (IL1RL-1): Un nuevo receptor inducido mecánicamente. Los autores de la presente invención han identificado, en el corazón, una ruta de señalización activada por estrés, posiblemente nueva: la regulación de la inducción de un gen 15
miembro de la familia de interleucina-1, T1/ST2. Se sabe muy poco de la inducción, señalización y función de T1/ST2 en cualquier tipo de célula y T1/ST2 ha mostrado en diferentes áreas de investigación tener dos funciones aparentemente no relacionadas. Una de estas es la regulación del crecimiento y la otra es la modulación inmunitaria. Tanto el crecimiento hipertrófico compensatorio como la modulación inmunitaria/inflamatoria están implicados en la patofisiología de enfermedades cardiovasculares.

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

25 Inmunidad. T1/ST2 se expresa en linfocitos T2 auxiliares pero no en linfocitos T1 auxiliares, del sistema inmune adaptativo, que produce interleucina-4, interleucina-5 e interleucina-10 (Yanagisawa KI, et al. J Biochem. 1997;121:95-103; Coyle AJ, et al. J Exp Med. 1999;190:895-902). Los linfocitos T2 auxiliares median respuestas beneficiosas contra infección, pero son nocivos en el desarrollo de alergia y asma. Existe una fuerte correlación entre la expresión de T1/ST2 y la producción de interleucina-4 en linfocitos T2 auxiliares (Coyle AJ, et al. J Exp Med. 1999;190:895-902). 30
T1/ST2 desempeña una función crítica para la diferenciación y activación de linfocitos T2 auxiliares, pero no de linfocitos T1 auxiliares (O'Neill LAJ, et al. Immunology Today. 2000;21:206-209).

La inhibición de la señalización de T1/ST2 atenúa la inducción, mediada por linfocitos T2 auxiliares, de respuestas inflamatorias eosinófilas en pulmón e inhibe la secreción de citocinas de linfocitos T2 auxiliares sin modificar la secreción del interferón-gamma de linfocitos T1 auxiliares (Coyle AJ, et al. J Exp Med. 1999;190:895-902). Estos 35
estudios indican que la expresión de T1/ST2 puede modificar el perfil de citocinas a favor de la expresión de interleucina-4, interleucina-5, interleucina-10. Hace poco se ha demostrado que la interleucina-10 tiene efectos antiinflamatorios en el entorno de lesión cardiaca (Ohtsuka T, et al. J Am Coll Cardiol, 2001;37:412-417). De manera similar, la ausencia de expresión de T1/ST2 podría dar como resultado un cambio hacia la expresión de interferón gamma, que puede ser nocivo después de lesión miocárdica.

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

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

50 Los autores de la presente invención comenzaron estudiar la inducción de T1/ST2 en miocitos cardiacos y su implicación en la señalización de supervivencia/muerte en el contexto de las rutas de señalización de miocitos. Estudios preliminares presentados más adelante demuestran que, en miocitos cardiacos, T1/ST2 se induce en respuesta a interleucina-1 y a tensión mecánica y que la inducción de T1/ST2 por interleucina-1 puede ser dependiente de la activación de NF- κ B. El ARNm de T1/ST2 también se induce en células del músculo liso vascular adulto humano en respuesta a la interleucina 1. La proteína T1/ST2 se expresa en el corazón de ratón precozmente después de isquemia 55
de miocardio *in vivo*, así como en el tejido aórtico humano de pacientes con placa inestable.

Resultados:

Estudios *in vitro*. Los siguientes estudios demuestran la inducción de T1/ST2 por tensión mecánica e interleucina-1, posiblemente a través de la activación de NF- κ B. Los dos transcritos de T1/ST2 (es decir, IL1RL-1S-soluble- e IL1RL-

1M-membrana-) se inducen por tensión en miocitos cardiacos, aunque el transcripto más abundante era la isoforma soluble. El ARNm de T1/ST2 se induce por tensión mecánica en miocitos cardiacos neonatales cultivados (Figura 8).

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

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

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

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

Estudios *in vivo*.

40 Materiales y métodos

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

Los estudios de pacientes y ELISA para ST2.

Estudio HEART. El estudio de terapia curativa y reductora de sobrecarga precoz (HEART, por sus siglas en inglés) era un ensayo controlado con placebo, aleatorio, de doble ocultación, en el que participaron 352 pacientes con infarto de miocardio (IM) agudo procedentes de 36 centros en los Estados Unidos y Canadá. Se admitieron hombres y mujeres, mayores de 21 años, que habían sufrido un IM en 24 horas. Previamente se describieron los criterios de inclusión y exclusión y los detalles del ensayo diseñado Pfeffer M.A., et al., Circulation, 1997, 95:2643-2651; Greaves S.C., et al.,

Am. J. Cardiol, 1997, 80:442-448; Solomon S.D., et al., Ann. Intern. Med., 2001, 134:451-458; Aikawa Y., et al., Am. Heart J, 2001, 141:234-242). Para este estudio, se disponía de muestras de sangre en serie de los días 1, 14 y 90 después de infarto de miocardio de 69 pacientes seleccionados al azar en el ensayo HEART. Se ensayó T1/ST2 soluble con un ensayo ELISA de tipo sándwich monoclonal doble que se ha descrito previamente (Kuroiwa K., et al., Hybridoma, 2000, 19:151-159). El ensayo se encuentra disponible en el mercado (MBL International, Watertown, MA).

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

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

Resultados:

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

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

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

Procedimientos y Resultados: Usando un ensayo ELISA de tipo sándwich monoclonal doble, los autores de la presente invención ensayaron muestras de sangre de los 69 participantes del estudio *HEART* el día del infarto de miocardio (día 1), así como los días 14 y 90 después del infarto. Como se muestra en la Figura 12a, la proteína T1/ST2 sistémica se aumentó significativamente un día después del infarto de miocardio (media \pm ETM, 3.8 ± 0.4 ng/mL, $p < 0.001$; intervalo, 0.32 a 17.42 ng/mL) en comparación con el día 14 (media \pm ETM, 0.98 ± 0.06 ng/mL; intervalo, 0.25 a 3.42 ng/mL) y con el día 90 (media \pm ETM, 0.79 ± 0.07 ng/mL; intervalo, 0.02 a 3.53 ng/mL; día 14 frente a día 90, $P = NS$). Los valores medios el día 90 fueron similares a los valores medios publicados para controles sanos (Kuroiwa K., et al., Hybridoma, 2000, 19:151-159). Los niveles de la proteína T1/ST2 sistémica se correlacionan positivamente con niveles de creatina quinasa máximos ($r = 0.41$, $p < 0.001$), como se muestra en la Figura 12b. Niveles elevados de la proteína ST2 sistémica se asociaron también con una fracción de expulsión baja un día después del infarto de miocardio como se muestra en el análisis cuartil ($p = 0.03$) en la Figura 12c.

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

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

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

Procedimientos y Resultados: Se usaron muestras de suero, variables clínicas y niveles de neurohormonas procedentes del subestudio neurohormonal del estudio 2 prospectivo aleatorio de supervivencia con amlodipino para insuficiencia cardiaca (*PRAISE-2*) (New York Heart Association functional class III or IV, end point: mortality or transplantation). El estudio *PRAISE-2* era un estudio controlado por placebo, grupal paralelo, con doble ocultación, al azar, multicentro, para evaluar el efecto de 10 mg/día de amlodipina sobre la supervivencia en pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva de etiología no isquémica. El ensayo consistió en la incorporación de pacientes procedentes de 240 lugares de los

Estados Unidos y Canadá. El subestudio neurohormonal consistió en la incorporación de 181 pacientes procedentes de 26 centros que participaban en el estudio principal. Tanto el PRAISE-2 principal como el subestudio neurohormonal fueron aprobados por el comité institucional de análisis de las instituciones participantes. Se admitieron pacientes que tenían al menos 18 años de edad, que habían padecido insuficiencia cardiaca de etiología no isquémica, con síntomas en reposo o después de ejercicio mínimo (New York Heart Association functional class III or IV) y una fracción de expulsión ventricular izquierda inferior al 30%. Todos los pacientes se trataron con inhibidores ACE y digoxina durante al menos 3 meses. Se excluyeron pacientes que habían tenido un historial reciente o antiguo de angina de pecho.

Ensayos para T1/ST2, neurohormonas y medición de estrés oxidativo. Se evaluaron muestras de sangre al inicio y a las 2 semanas (Tabla 1). La T1/ST2 soluble se midió con un procedimiento ELISA de anticuerpo monoclonal de tipo sándwich doble (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd., Nagoya, Japón) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Resumiendo, se incubaron muestras de suero o patrones en los micropozos revestidos con anticuerpos anti T1/ST2 humanos. Después de lavar, en los micropozos se añadió anticuerpo anti- humano T1/ST2 conjugado con peroxidasa y se incubaron. Después de otro lavado, se añadió sustrato de peroxidasa y se determinó la densidad óptica a 450 nm. Se midieron las catecolaminas en circulación (norepinefrina, epinefrina, dopamina), la angiotensina II, los péptidos natriuréticos (péptido natriurético pro-atrial (PNPro-A), péptido natriurético cerebral (PNC)) y los índices de estrés oxidativo (malondialdehído, adrenolutina) como se ha descrito anteriormente (Dhalla KS, et al., Mol Cell Biochem, 1989;87:85-92; Moe GW, et al., Am Heart J, 2000;139:587-95). Se realizaron mediciones de suero de T1/ST2 sobre muestras procedentes de 162 pacientes obtenidas en la incorporación del ensayo y de 135 de los mismos pacientes obtenidas 2 semanas después de la incorporación del ensayo. Los niveles iniciales de T1/ST2 se correlacionaron con niveles de PNC iniciales ($r=0,3511$, $p<0,0001$), niveles de PNProA iniciales ($r=0,3598$, $p<0,0001$) y niveles de norepinefrina iniciales ($r = 0,3854$, $p<0,0001$) (Tabla 2). El cambio en T1/ST2 (niveles de T1/ST2 a las 2 semanas menos los niveles de T1/ST2 en la incorporación del ensayo) fue significativo como una predicción univariante de mortalidad o trasplante ($p=0,048$) como el del PNC inicial ($p<0,0001$) y el PNPro-A inicial ($p<0,0001$) (Tabla 3). En modelos multivariantes que incluyen PNC y PNProA, el cambio en T1/ST2 permaneció significativo como una predicción independiente de mortalidad o trasplante independiente del PNC y del PNPro-A (Tabla 4).

Tabla 1. Características iniciales

A. Todos los pacientes

	N	Mediana	5° Percentil	95° Percentil
ST2 inicial (ng/mL)	161	0.24	0.16	0.70
BNP inicial (pmol/L)	162	56.0	3.70	264.30
PNProA inicial (pg/L)	162	1778.50	531.00	5615.00
Norepinefrina (pg/mL)	158	401.58	165.90	1096.00
Dopamina (pg/mL)	158	39.06	4.22	398.40
Epinefrina (pg/mL)	158	54.92	11.64	139.90
Angiotensina II (pg/mL)	157	22.60	7.00	67.30
Adrenolutina (ng/mL)	156	22.84	4.31	369.31
Creatinina (mmol/L)	158	1.10	0.80	1.90
Edad (años)	157	59.9	32.5	78.2
Índice de Masa Corporal (kg/mm ²)	157	27.6	20.4	39.7
Fracción de expulsión LV	158	22.0	11.0	30.0

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

	N	Mediana	5° Percentil	95° Percentil
ST2 inicial (ng/mL)	135	0.24	0.15	0.81
PNC inicial (pmol/L)	135	54.90	3.30	264.30
PNProA inicial (pg/L)	135	1788.00	488.00	4788.00

Norepinefrina (pg/mL)	130	395.05	171.70	1118.00
Dopamina (pg/mL)	130	64.02	4.32	405.50
Epinefrina (pg/mL)	130	56.07	12.24	134.80
Angiotensina II (pg/mL)	131	21.70	7.00	58.30
Adrenolutina (ng/mL)	130	24.41	4.43	369.31
Creatinina (mmol/L)	135	1.10	0.80	2.00
Edad (años)	134	60.5	34.4	78.2
Índice de Masa Corporal (kg/mm2)	134	27.4	20.5	39.7
Fracción de expulsión LV	135	22.0	11.0	30.0

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

		ST2 inicial	Cambio en ST2
PNC inicial (pmol/L)	R	0.3511	-0.11327
	<i>valor p</i>	<0.0001	0.1843
	N	161	139
PNProA inicial (pmol/L)	R	0.35979	-0.10967
	<i>valor p</i>	<0.0001	0.1987
	N	161	139
Cambio en PNC* (pmol/L)	R	-0.10184	0.21497
	<i>valor p</i>	0.2329	0.0110
	N	139	139
Cambio en PNProA* (pmol/L)	R	0.05584	0.28847
	<i>valor p</i>	0.5138	0.0006
	N	139	139
Norepinefrina (pg/mL)	R	0.38535	-0.25253
	<i>valor p</i>	<0.0001	0.0032
	N	156	134
Dopamina (pg/mL)	R	0.07879	0.22127
	<i>valor p</i>	0.3283	0.0102
	N	156	134
Epinefrina (pg/mL)	R	0.08043	-0.12110
	<i>valor p</i>	0.3182	0.1634
	N	156	134
Angiotensina II (pg/mL)	R	0.00374	-0.00725

	<i>valor p</i>	0.9630	0.9335
	N	156	135
Adrenolutina (ng/mL)	R	0.00544	-0.10422
	<i>valor p</i>	0.9464	0.2308
	N	155	134
Creatinina (unidades)	R	0.16567	0.02513
	<i>valor p</i>	0.0388	0.7724
	N	156	135
Fracción de Expulsión LV	R	-0.08006	0.03651
	<i>valor p</i>	0.3205	0.6742
	N	156	135
Edad (años)	R	-0.11768	0.19260
	<i>valor p</i>	0.1447	0.0274
	N	155	134
Índice de Masa Corporal (unidades)	R	0.04561	-0.05410
	<i>valor p</i>	0.5731	0.5347
	N	155	134

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

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

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

Género	1.225	0.576-2.728	0.6061
Edad	1.435	1.099-1.914	0.0104
Etiología	1.543	0.744-3.336	0.2543
Índice de Masa Corporal, por 1 kg/mm ²	0.972	0.919-1.021	0.2876

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

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

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

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

5

Ejemplo 3

Procedimientos

10

15

20

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

Análisis de laboratorio. Se evaluaron muestras de suero recogidas al inicio, y después de 1, 3, 12 y 24 horas de la incorporación en TIMI 14. Solo se disponía de las muestras de suero iniciales del ensayo ENTIRE. El suero se aisló a los 60 minutos de la recogida de las muestras y se conservó a -20 °C o a menor temperatura hasta su transporte al TIMI

Biomarker Core Lab (Boston, MA), donde las muestras se conservaban a -70°C . La ST2 soluble se midió con un procedimiento ELISA de anticuerpo monoclonal doble de tipo sándwich (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd., Nagoya, Japón). Las muestras de suero o patrones se incubaron en micropozos revestidos con anticuerpo anti ST2 humano. Después de lavar, se añadió a los micropozos anticuerpo anti-ST2 humano conjugado con peroxidasa y se incubaron. Después de lavar de nuevo, se añadió el sustrato de peroxidasa y se determinó la densidad óptica a 450 nm. Se midieron la proteína reactiva C de alta sensibilidad (PRC-as, Dade-Behring Inc, Deerfield, IL), la isoenzima creatina quinasa MB (CK-MB), el péptido natriurético de tipo cerebral (SHIONORIA BNP, Shionogi, Osaka, Japón) y la troponina cardiaca I (ACS:180, Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY) usando procedimientos descritos anteriormente (Morrow DA et al., J Am Coll Cardiol. 1998;31:1460-5; Morrow DA et al., Clin Chain. 2000;46:453-460). Los niveles de la isoenzima creatina quinasa se midieron localmente en el sitio de admisión, a las 3 horas, y a intervalos de 6 a 8 horas durante las primeras 24 horas. Debido a la disponibilidad de las muestras, los niveles del PNC se midieron en las muestras de ENTIRE-TIMI 23, pero no en las de TIMI 14.

Análisis estadísticos. Los pacientes se dividieron en cuartiles basándose en sus niveles en suero de ST2 en el momento de la incorporación en los estudios. Los niveles de ST2 se describen usando la mediana y percentiles 25°- 75°. La asociación entre las características clínicas iniciales y los cuartiles de ST2 se analizaron usando el ensayo de Kruskal-Wallis para variables continuas y el ensayo de la X^2 para variables categóricas. Las correlaciones entre ST2 y otras variables iniciales continuas se estudiaron con un coeficiente de correlación (de Spearman) no paramétrico. Para la evaluación de asociación con resultados clínicos, se comparó la ST2 entre pacientes que cumplían un criterio de valoración de estudio y los que no usaban el ensayo de Wilcoxon de la suma de rangos. El análisis multivariable de la asociación de ST2 con los resultados se realizó usando regresión logística incluyendo términos para predicciones establecidas de mortalidad en infarto de miocardio por elevación de ST (IMEST) (Morrow, DA et al., Circulation 2000; Oct 24; 102(17):2031-7). Excepto cuando se indique, los resultados presentados son para la población del estudio TIMI 14 y ENTIRE-TIMI 23 combinado.

Resultados

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

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

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

Hipercolesterolemia	22%	21%	21%	29%	0.2	0.1
Hábito de fumar:						
Fumador actual	57%	48%	49%	48%	0.2	0.06
Hallazgos físicos						
Peso en kg	83 ± 16	81 ± 15	82 ± 14	83 ± 15	0.4	0.8
PS sistólica (mm Hg)	139 ± 21	138 ± 22	141 ± 23	143 ± 22	0.1	0.05
FC (PNC)	71 ± 17	75 ± 17	72 ± 16	80 ± 17	0.001	<0.0001
Clase Killip II-IV	2.0%	1.5 %	3.6%	4.5%	0.3	0.2
Ensayo de Diagnóstico						
cTnl >0.1 ng/mL*	61%	69%	77%	84%	0.001	<0,0001
PNC > 80 pg/mL*	1.8%	5.4%	7.2%	14.4%	0.003	0.001
CRP > 1.5 ng/mL	2.1%	8.8%	8.1%	11.4%	0.006	<0.0001
Creatinina mg/dl	1.0 ± 0.21	1.0 ± 0.20	1.0 ± 0.25	1.1 ± 0.28	± 0.1	0.03
Grado de EAC (estenosis al 50%)					0.3	0.2
1 vaso	48%	55%	45%	50%		
2 vasos	38%	28%	34%	30%		
3 vasos	15%	18%	20%	20%		
EF (%)**	58 ± 15	58 ± 15	57 ± 15	57 ± 15	1.0	0.9

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

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

Tabla 6. Correlación entre ST2 y Variables Continuas

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

DT = Dolor Torácico; CKMB = isoenzima de creatina quinasa MB; cTnl = Troponina Cardíaca I; PNC = Péptido Natriurético tipo B; PRC = Proteína Reactiva C; EAC = Enfermedad Arterial Coronaria; FE = Fracción de Expulsión
*Medida sólo en la población ENTIRE-TIMI 23; N=448 excepto **(N=469)

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

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

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

IM= Infarto de Miocardio; ICC = Insuficiencia Cardíaca Congestiva

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

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

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

En este estudio, los autores de la presente invención exploraron la posible función de la medición en suero de un receptor recientemente identificado de la familia de interleucina-1 en infarto de miocardio agudo. La forma soluble de este receptor se secreta rápidamente por miocitos cardíacos cuando las células se sobrecargan biomecánicamente; esto sugiere que el receptor puede desempeñar una función en condiciones en las que el miocardio se sobrecarga rápidamente, tal como en un infarto de miocardio. Para explorar esto, los autores de la presente invención midieron los niveles séricos de ST2 en el momento de la presentación en una cohorte de pacientes con infarto de miocardio agudo. Los resultados demuestran que, en estos pacientes, los niveles de ST2 en el momento de la presentación están asociados con hospitalización y mortalidad a los 30 días. Adicionalmente, análisis multivariante realizado indicó que el nivel de ST2 está asociado independientemente con el resultado después del control de factores clínicos importantes.

Por lo tanto, el significado de estos datos es doble. Primero, estos datos sugieren que la familia de receptores de interleucina, que participa en la defensa del hospedador y en la diferenciación de linfocitos T (Sims JE. IL-1 and IL-18 receptors, and their extended family. *Curr Opin Immunol.* 2002;14:117-22), puede participar en episodios tempranos de infarto de miocardio agudo. Estos datos implican que este receptor es una posible nueva diana para modificar el pronóstico en pacientes con infarto de miocardio. En segundo término, ST2 representa un nuevo biomarcador que ofrece información de pronóstico en pacientes con infarto de miocardio agudo; por tanto, extendiéndose sobre el trabajo

previo de los autores de la invención que demuestra una asociación entre ST2 y mortalidad entre pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva no isquémica (Weinberg EO, Shimpo M, Hurwitz S, Tominaga S, Rouleau JL, Lee RT. Identification of serum soluble ST2 receptor as a novel heart failure biomarker. *Circulation*. 2003;107:721-6), otra afección de sobrecarga de miocardio.

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

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

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

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

LISTADO DE SECUENCIAS

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

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

40 <130> B00801.70284.WO

<150> US 60/379.173

<151> 2002-05-09

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.0

45 <210> 1

<211> 1357

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

50 <221> CDS

ES 2 685 697 T3

<222> (47)..(1033)

<223> HUMST2M, D12763, NM_003856

<400> 1

```

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

```

ES 2 685 697 T3

```

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

```

<210> 2

<211> 328

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

```

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

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

```

<210> 3

<211> 2058

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (272)..(1942)

<223> AB012701

10 <400> 3

ES 2 685 697 T3

```

aaagagaggc tggctgttgt atttagtaaa gctataaagc tgtaagagaa attggccttc      60
tgagttgtga aactgtgggc agaaagttga ggaagaaaga actcaagtac aacccaatga      120
ggttgagata taggctactc ttcccaactc agtcttgaag agtatcacca actgcctcat      180
gtgtggtgac cttcaactgc gtatgccagt gactcatctg gagtaatctc aacaacgagt      240
taccaatact tgctcttgat tgataaacag a atg ggg ttt tgg atc tta gca      292
                               1      5
                               Met Gly Phe Trp Ile Leu Ala
att ctc aca att ctc atg tat tcc aca gca gca aag ttt agt aaa caa      340
Ile Leu Thr Ile Leu Met Tyr Ser Thr Ala Ala Lys Phe Ser Lys Gln
                               10      15      20
tca tgg ggc ctg gaa aat gag gct tta att gta aga tgt cct aga caa      388
Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu Ile Val Arg Cys Pro Arg Gln
                               25      30      35
gga aaa cct agt tac acc gtg gat tgg tat tac tca caa aca aac aaa      436
Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp Tyr Tyr Ser Gln Thr Asn Lys
40      45      50      55
agt att ccc act cag gaa aga aat cgt gtg ttt gcc tca ggc caa ctt      484
Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg Val Phe Ala Ser Gly Gln Leu
                               60      65      70
ctg aag ttt cta cca gct gaa gtt gct gat tct ggt att tat acc tgt      532
Leu Lys Phe Leu Pro Ala Glu Val Ala Asp Ser Gly Ile Tyr Thr Cys
                               75      80      85
att gtc aga agt ccc aca ttc aat agg act gga tat gcg aat gtc acc      580
Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg Thr Gly Tyr Ala Asn Val Thr
90      95      100
ata tat aaa aaa caa tca gat tgc aat gtt cca gat tat ttg atg tat      628
Ile Tyr Lys Lys Gln Ser Asp Cys Asn Val Pro Asp Tyr Leu Met Tyr

```


ES 2 685 697 T3

```

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

```

<210> 4

<211> 556

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 685 697 T3

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

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

<210> 5

<211> 2586

<212> ADN

5 <213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (202)..(1212)

<223> Fit-1S

10 <400> 5

ES 2 685 697 T3

```

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

```

ES 2 685 697 T3

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

ES 2 685 697 T3

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

<210> 6

<211> 336

<212> PRT

5 <213> Rattus norvegicus

<400> 6

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

<210> 7

<211> 2065

<212> ADN

5 <213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (275)..(1975)

<223> Fit-1M

<400> 7

```

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

```

ES 2 685 697 T3

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

ES 2 685 697 T3

```

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

```

<210> 8

<211> 566

<212> PRT

5 <213> Rattus norvegicus

<400> 8

ES 2 685 697 T3

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

ES 2 685 697 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Un agente que es un agente antiinflamatorio, un agente antitrombótico, un agente antiplaquetario, un agente fibrinolítico, un agente reductor de lípidos, un inhibidor directo de la trombina, un inhibidor del receptor de la glicoproteína IIb/IIIa, un agente que se une a moléculas de adhesión celular e inhiben la capacidad de los glóbulos blancos para unirse a las moléculas de adhesión celular, un bloqueador de los canales de calcio, un bloqueador de los receptores beta-adrenérgicos, un inhibidor de la ciclooxigenasa-2 o un inhibidor del sistema renina-angiotensina (RAS), para uso en un método para tratar un sujeto para reducir el riesgo de una afección cardiovascular que se desarrolla en el sujeto, en el que el estado cardiovascular se selecciona de insuficiencia cardíaca e infarto de miocardio, y en el que el sujeto se identifica usando un método in vitro que comprende:
- 5 obtener un nivel de proteína IL1RL-1 soluble en una muestra biológica del sujeto;
- comparar el nivel de proteína IL1RL-1 soluble con un único valor de corte predeterminado específico para el diagnóstico de insuficiencia cardíaca o infarto de miocardio;
- en el que un nivel de la proteína IL1RL-1 soluble igual a o superior al único valor de corte predeterminado es indicativo de si el sujeto se beneficiará del tratamiento con el agente.
- 15 2. El agente para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proteína IL1RL-1 soluble es un producto de expresión de una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1, o comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
3. El agente para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la muestra comprende sangre o suero.
- 20 4. El agente para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la determinación se realiza usando un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a la proteína IL1RL-1 soluble.
5. El agente para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente es un agente reductor de lípidos.
6. El agente para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el agente reductor de lípidos se selecciona del grupo que consiste en: gemfibrozilo, crisolipemina, colestipol, ácido nicotínico, probucol, lovastatina, fluvastatina, simvastatina, atorvastatina, pravastatina y cerivastatina.
- 25 7. El agente para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente es un bloqueador del receptor beta-adrenérgico o un inhibidor de RAS.
8. El agente para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el inhibidor de RAS se selecciona del grupo que consiste en: un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), un bloqueador de receptor de angiotensina II (BRA), un agente que activa el catabolismo de angiotensina II. y un agente que previene la síntesis de angiotensina I.
- 30 9. El agente para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el bloqueador del receptor beta-adrenérgico se selecciona del grupo que consiste en: atenolol, acebutolol, alprenolol, befunolol, betaxolol, bunitrolol, carteolol, celiprolol, hedroxalol, indenolol, labetalol, levobunolol, mepindolol, metipranolol, metindol, metoprolol, metrizoranolol, oxprenolol, pindolol, propranolol, practolol, practolol, sotalolnadolol, tiprenolol, tomalolol, timolol, bupranolol, penbutolol, trimepranol, 2-(3-(1,1-dimetiletil)-amino-2-hidroxiopropoxi)-3-piridenocarbonitril, 1-butilamino-3-(2,5-dichlorofenoxi)-2-propanol, 1-isopropilamino-3-(4-(2-ciclopropilmetoxietil)fenoxi)-2-propanol, 3-isopropilamino-1-(7-metilindan-4-iloxi)-2-butanol, 2-(3-t-butilamino-2-hidroxi-propiltio)-4-(5-carbamoil-2-tienil)tiazol, y 7-(2-hidroxi-3-tbutilaminpropoxi) ftalida.
- 35 10. El agente para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el sujeto es hipercolesterolémico, hipertrigliceridémico o hiperlipidémico.
- 40 11. El agente para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el sujeto es fumador o hipertenso.
12. El agente para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el sujeto es humano.

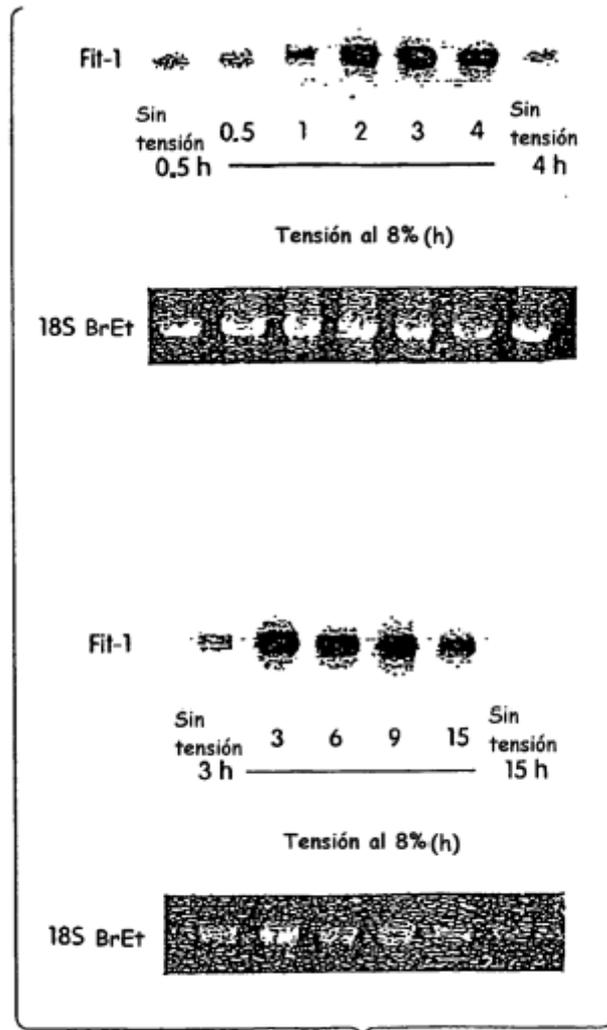


Fig. 1

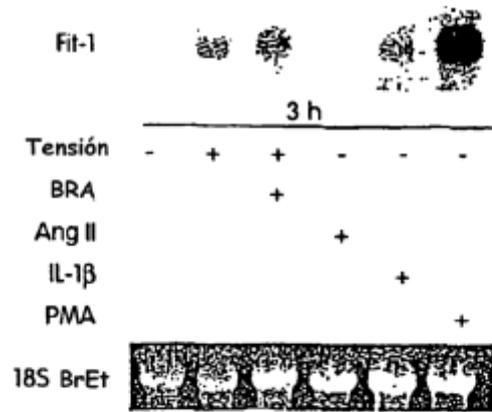


Fig. 2

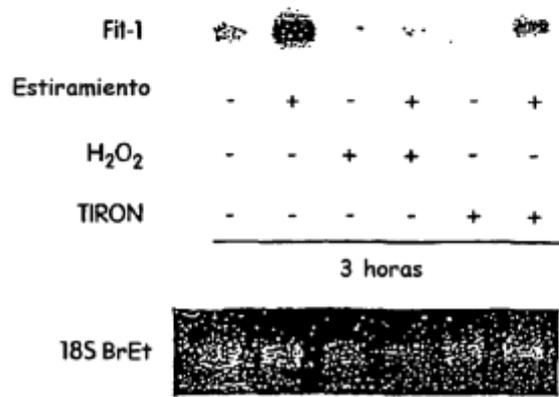


Fig. 3

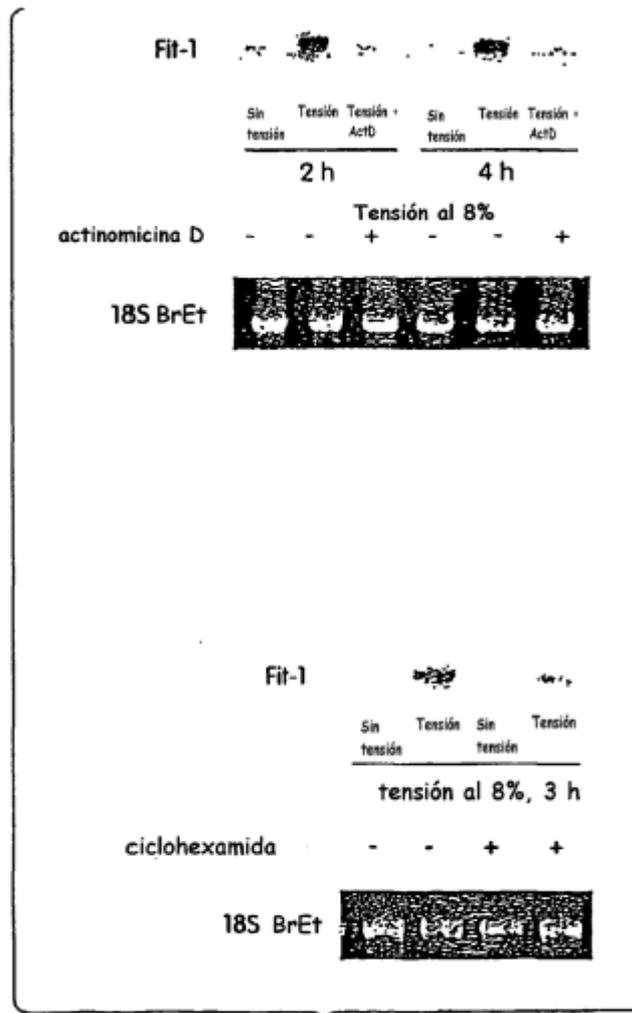


Fig. 4

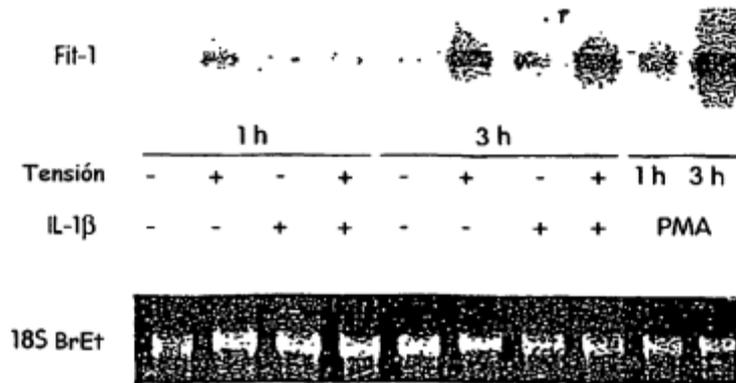


Fig. 5

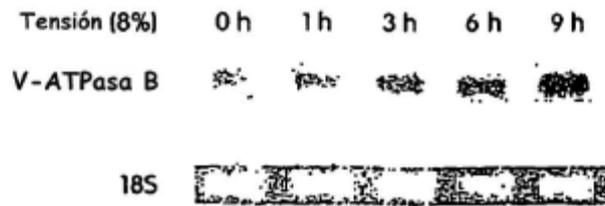


Fig. 6

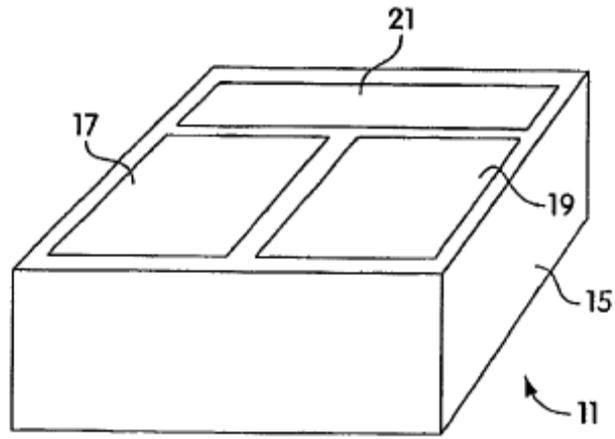


Fig. 7

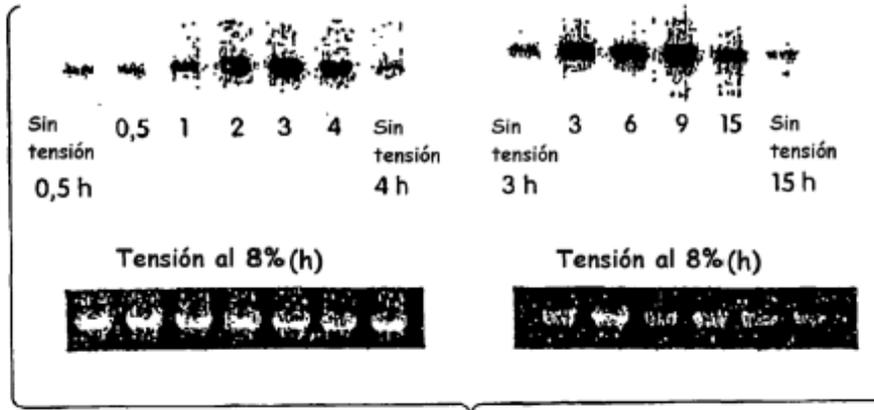


Fig. 8

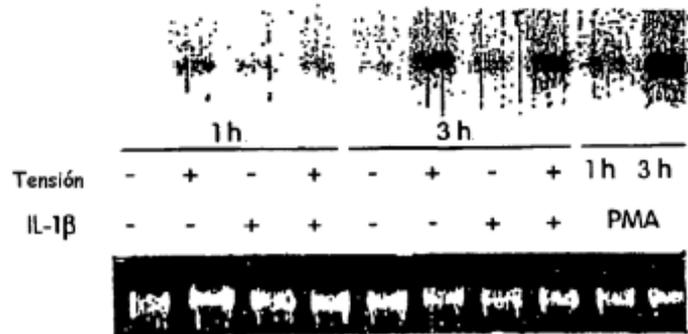


Fig. 9

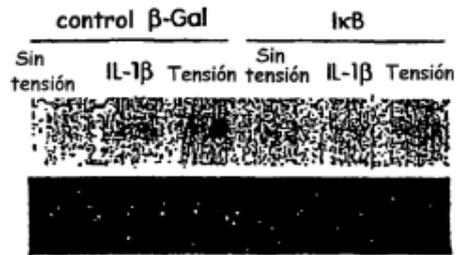


Fig. 10

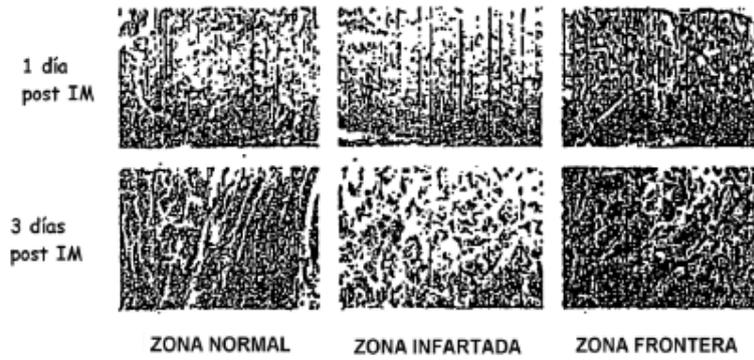


Fig. 11

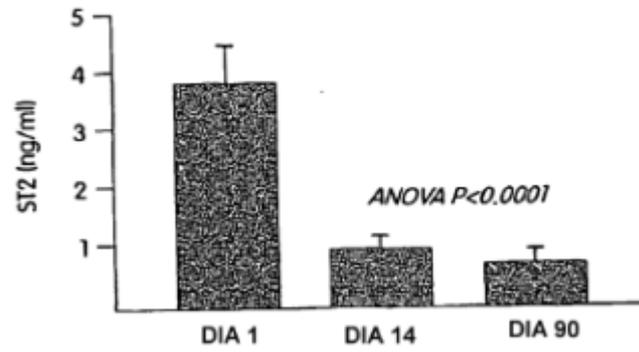


Fig. 12A

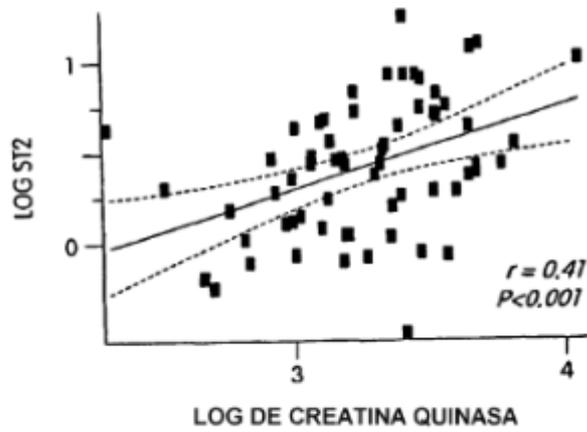


Fig. 12B

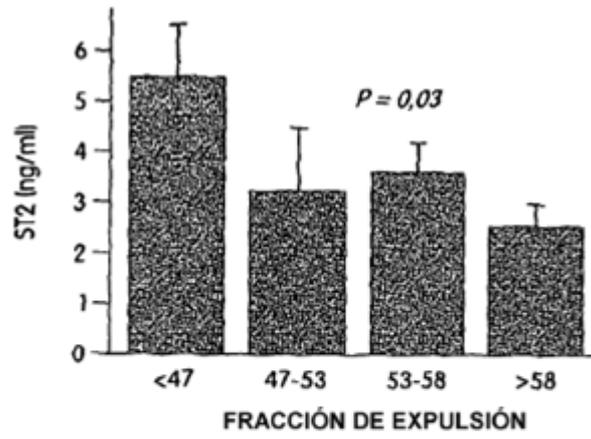


Fig. 12C

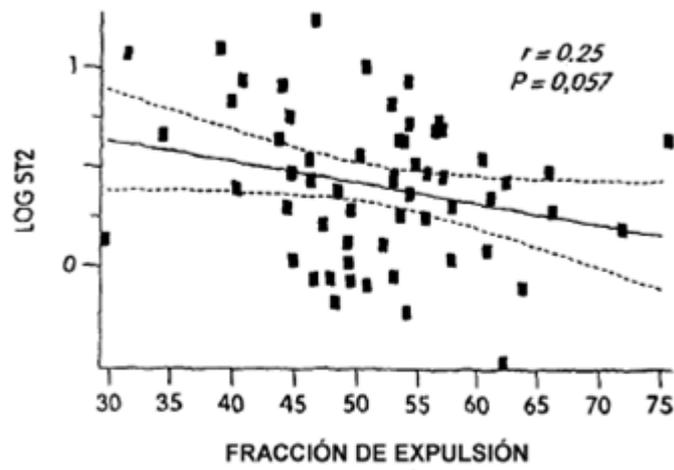


Fig. 12D

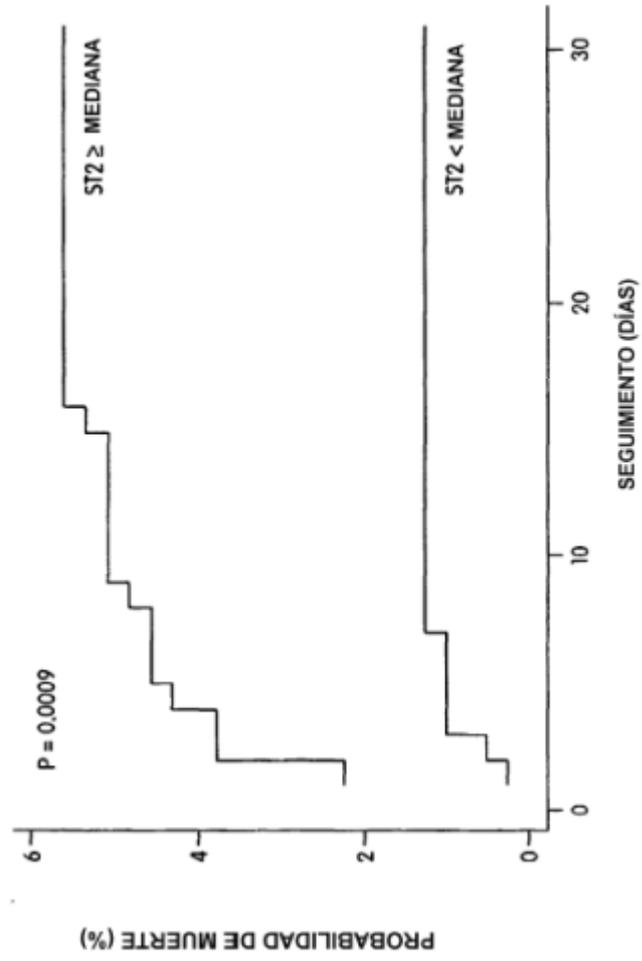


Fig. 13