

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2003.08.06	(73) Titular(es): NOVARTIS AG LICHTSTRASSE 35 4056 BASEL NOVARTIS PHARMA GMBH CH AT
(30) Prioridade(s): 2002.08.07 US 401694 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2005.05.11	
(45) Data e BPI da concessão: 2009.07.01 176/2009	(72) Inventor(es): ROGER MICHAEL LANE US MIHAEL HRISTOS POLYMERPOULOS US
	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DA DEMÊNCIA COM BASE NO GENÓTIPO DA APO E**

(57) Resumo:

RESUMO

**"MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DA DEMÊNCIA COM BASE NO GENÓTIPO
DA APO E"**

Esta invenção refere-se a métodos para a prevenção do agravamento do e/ou para melhorar o funcionamento cognitivo e os problemas de comportamento em pacientes com demência devido ao genótipo da ApoE para dirigir a utilização de fármacos AChEI, incluindo a rivastigmina. Estão também incluídos os estojos ("kits") para a determinação da condição da ApoE4 e da estratégia de tratamento recomendada.

DESCRIÇÃO

"MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DA DEMÊNCIA COM BASE NO GENÓTIPO DA APO E"

Antecedentes da Invenção

Campo da Invenção

A presente invenção pertence ao campo da farmacologia e da medicina.

Em particular, esta invenção refere-se à utilização da análise genómica para a determinação da receptividade dos pacientes com demência ao tratamento com inibidores de colinesterase (ChEIs).

Descrição de Trabalhos Relacionados

A demência é um grupo de estados de doença heterogéneos e multicausais caracterizado pelo desenvolvimento de défices cognitivos múltiplos que incluem a deterioração da memória e pelo menos um dos seguintes distúrbios cognitivos: afasia, apraxia, agnosia ou um distúrbio no funcionamento executivo. A Doença de Alzheimer (AD) ou DAT é a principal causa de demência nos idosos e é a quarta principal causa de morte nos países desenvolvidos (após a

doença cardíaca, o cancro e o derrame cerebral). Até 70% de casos de demência devem-se à AD, com a doença dos vasos sanguíneos (derrame cerebral, aterosclerose) a ser a segunda causa mais comum. A frequência de AD entre os 60 anos de idade é de cerca de 1%. A incidência duplica aproximadamente a cada 5 anos, sendo de 2% aos 65, 4% aos 70, 8% aos 75, 16% aos 80 e 32% aos 85 anos de idade. Ver Forsyth, Phys. Ther., Vol. 78, pp. 1325 - 1331 (1998); Evans et al., JAMA, Vol. 262, pp. 2551 - 2556 (1989). Estima-se que cerca de dois terços da população com 90 anos sofra de alguma forma de demência. Ver Merritt, Textbook of Neurology, 6th Edition, Lea & Febiger, pp. 484 - 489, Philadelphia, PA (1979); e Gilroy & Meyer, Medical Neurology, MacMillan Publishing Co., pp. 175 - 179 (1979). A AD atinge uns estimados quatro milhões de seres humanos apenas nos Estados Unidos com um custo de 100 biliões de dólares por ano. Ver Schumock, J. Health Syst. Pharm., Vol. 55, No. 52, pp. 17 -21 (1998); e Hay & Ernst, Am. J. Public Health, Vol. 77, pp. 1169 - 1175 (1987).

Adicionalmente, a doença é encontrada a níveis muito mais baixos nos grupos mais jovens, iniciando-se ocasionalmente cerca dos 30 anos de idade e ainda mais raramente no fim da infância. Ver Adams & Victor, Principles of Neurology, pp. 401 - 407 (1977).

A AD é incurável. Leva à morte numa média de 8 anos após o diagnóstico, sendo os últimos 3 normalmente passados numa instituição. Além da perda de memória, os

pacientes com AD apresentam drásticas alterações de personalidade, desorientação, declínio da coordenação física e uma incapacidade de tomarem conta de si próprios, diminuição das actividades do dia-a-dia (ADL), deterioração cognitiva progressiva, distúrbio comportamental, isto é, deambulação, agitação, agressividade; e sinais/sintomas psiquiátricos incluindo, mas não limitados a, psicose, depressão, e ansiedade. A taxa média da depressão major, da psicose e da agitação na AD é de aproximadamente 8%, 20% e 20%, respectivamente. Ver Mayeux e Sano, NEJM, Vol. 341, pp. 1670 - 1679 (1999).

Genética da AD

A AD é o tipo de doença mais comum que se caracteriza pela deterioração cognitiva progressiva. Ver Bayles, Semin. Speech Lang., Vol. 22, No. 4, pp. 251 - 259 (2001); e Storey et al., Front Biosci., Vol. 7, pp. E155 - E184 (2002). Na última década, foram efectuados progressos substanciais para o entendimento da patogénese da AD e diversos factores de risco foram associados com a AD incluindo os antecedentes genéticos e a idade. Ver a Revista Tanzi et al., Neuron., Vol. 32, No. 2, pp. 181 - 184 (2001); a Revista Myers et al., Curr. Opin. Neurol., Vol. 14, No. 4, pp. 433 - 440 (2001); e a Revista Shastri, "Molecular and Cell Biological Aspects of Alzheimer Disease", J. Hum. Genet., Vol. 46, No. 11, pp. 609 - 618 (2001).

Enquanto que a etiologia exacta da AD é desconhecida, a evidência de uma contribuição genética advém de diversas observações importantes, tais como a incidência familiar, a análise genealógica, os estudos em gémeos dizigóticos e monozigóticos e a associação da doença com o síndrome de Down. Os estudos da incidência e os padrões de transmissão em famílias de pacientes com AD demonstra que parentes de indivíduos afectados possuem um risco acrescido para o desenvolvimento da AD quando comparado com membros da população geral. As taxas de concordância entre co-gémeos de propósitos monozigóticos com AD são de 40 - 60%, sugerindo assim uma forte mas não absoluta influência genética na doença. Para uma revisão geral ver Baraitser, "The Genetics of Neurological Disorders", 2nd Edition, pp. 85 - 88 (1990).

Têm sido associados quatro genes à AD. Estes genes estão localizados nos cromossomas 1, 14, 19 e 21. O cromossoma 21 contém o gene que codifica para o precursor da β -amilóide, isto é, a proteína precursora da amilóide (APP). Este gene foi clonado em 1987 após se observar que a demência se desenvolvia numa elevada proporção de indivíduos com síndrome de Down (Trissomia 21) que sobreviviam até à idade adulta e nos quais a patologia do tipo AD estava presente na autópsia. A subsequente descoberta de mutações no gene da proteína precursora da amilóide em famílias com o início precoce da AD familiar sugere que a sobreprodução da β -amilóide está associada com alguns casos de AD.

O gene da presenilina (*PS1*) no cromossoma 14 foi localizado em 1992 através da utilização de estratégias de ligação genética em famílias com o início precoce de AD. Aproximadamente 25 mutações diferentes em várias áreas da proteína têm sido encontradas em famílias brancas, judaicas Ashkenazi, Hispânicas e Japonesas. Outro gene, da presenilina 2 (*PS2*), foi localizado no cromossoma 1 após a avaliação de diversas famílias Alemãs do Volga com AD autossômica dominante de início precoce. Os pacientes com mutações *PS1* possuem uma idade precoce de início característica, entre os 35 e os 60 anos de idade. As mutações *PS2* encontram-se quase exclusivamente em famílias de herança Alemã do Volga. A maioria dos pacientes que se encontram em clínicas não são prováveis candidatos para o teste de mutações da presenilina, apesar do teste da *PS1* estar comercialmente disponível. O cromossoma 12 pode conter uma mutação causativa relevante para o início tardio da AD e está presentemente sob estudo.

O Papel da Apolipoproteína E (ApoE)

Nos últimos anos, a pesquisa sugeriu que a ApoE desempenha um papel potencial na patogénese da AD. A ApoE desempenha várias funções como uma proteína constituinte das lipoproteínas do plasma, incluindo o seu papel no metabolismo do colesterol. Foi primeiramente identificada como um constituinte das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) sintetizadas pelo fígado que transportam os triglicéridos do fígado para os tecidos periféricos.

A informação genética mais importante em pacientes com AD de início tardio provém da análise dos polimorfismos do gene da ApoE. Ver Scarmeas et al., *Neurology*, Vol. 58, No. 8, pp. 1182 - 1188 (2002). O gene da ApoE contém três isoformas principais, a ApoE2, a ApoE3 e a ApoE4, que diferem uma das outras apenas pelas substituições únicas de aminoácidos. Ver Rosenberg, "The Molecular and Genetic Basis of Alzheimer's Disease: The End of the Beginning: The 2000 Wartenberg Lecture", *Neurology*, Vol. 54, No. 11, pp. 2045 - 2054 (2000).

A ApoE é uma proteína do plasma envolvida no transporte do colesterol e é codificada por uma gene no cromossoma 19. É sintetizada primeiramente no fígado e pensa-se estar envolvida na reparação dos sistemas nervosos após os ferimentos. O genótipo da ApoE é um contribuinte importante para a susceptibilidade à AD mas encontra-se em diversas outras doenças neurodegenerativas, tais como a demência pugilística. Três alelos comuns, o E2, o E3 e o E4, correspondem a seis fenótipos. O alelo de $\epsilon 4$ foi identificado como um factor de risco para a AD, com o risco estimado atribuído a ser de 45 - 60%. Os homozigotas de E4 são de maior risco do que os heterozigotas de E4. A ApoE4 está presente em placas e pode facilitar a acumulação amilóide no cérebro.

A associação do alelo da ApoE4 a um risco mais elevado e a um início precoce da AD deve-se provavelmente à

sua afinidade mais elevada para a proteína da β -amilóide quando comparada com as outras isoformas, o que resulta na reduzida remoção da proteína da β -amilóide. Ver a Revista Selkoe, "Translating Cell Biology into Therapeutic Advances in Alzheimer's Disease", Nature, Vol. 399, Suppl. 6738, pp. A23 - A31 (1999).

A ApoE contribui para o metabolismo da lipoproteína de diversas formas. Ver Mahley et al., J. Lipid Res., Vol. 25, pp. 1277 - 1294 (1984). É um sítio de reconhecimento para diversos receptores das lipoproteínas celulares, incluindo os receptores do hepatócito para o remanescente do quilomícron e da VLDL. Ver Hui et al., J. Biol. Chem., Vol. 259, pp. 860 - 869 (1984); e Shelburne et al., J. Clin. Invest., Vol. 65, pp. 652 - 658 (1980).

As lipoproteínas enriquecidas com a ApoE têm sido também descritas por possuírem uma função no sistema imunitário através da inibição da proliferação de linfócitos estimulada pelo mitogénio ou pelo antigénio *in vitro* e *in vivo*. No ovário, a ApoE inibe a produção de androgénio através do cultivo de células tecaais e intersticiais estimuladas por LH. Ver Dyer et al., J. Biol. Chem., Vol. 263, p. 10965 (1988).

A nova fundamentação de que as lipoproteínas que contêm a ApoE e a ApoB são importantes reguladores para a função dos linfócitos adveio de estudos das propriedades inibitórias das lipoproteínas do plasma do sangue do cordão

umbilical. Ver Curtiss et al., J. Immunol., Vol. 133, p. 1379 (1984). Nestes estudos foi estabelecida uma correlação directa entre a ApoE e a inibição.

Existem três isoformas principais da ApoE, referidas como ApoE2, ApoE3 e ApoE4 que são os produtos de três alelos num único locus genético. Três fenótipos homozigóticos (ApoE2/2, E3/3 e E4/4) e três fenótipos heterozigóticos (ApoE3/2, E4/3 e E4/2) advêm a partir da expressão de quaisquer dois dos três alelos. O fenótipo mais comum é a ApoE3/3 e o alelo mais comum é o E3. Ver Mahley, Science, Vol. 240, pp. 622 - 630 (1988).

As sequências de aminoácidos dos três tipos diferem apenas ligeiramente. A ApoE4 difere da ApoE3 tal que na ApoE4 a arginina é substituída pela cisteína que ocorre normalmente no resíduo de aminoácido 112. A forma mais comum da ApoE2 difere da da ApoE3 no resíduo 158, onde a cisteína é substituída pela arginina que ocorre normalmente. Ver Mahley (1988), *supra*. Os fenótipos e os genótipos da ApoE estão bem descritos e são conhecidos na área como descrito acima. O sistema de nomenclatura estabelecido bem como os fenótipos e os genótipos para a ApoE, estão descritos em, por exemplo, Zannis et al., J. Lipid. Res., Vol. 23, p. 911 et seq. (1982), que está aqui incorporado por referência.

Os indivíduos com o genótipo da ApoE4/4 são oito vezes mais susceptíveis de serem afectados pela AD do que

os indivíduos com o genótipo da ApoE2/3 ou o da ApoE3/3. Adicionalmente, a média de idades para o início da AD e a média de idades para a sobrevivência é menor para aqueles que possuem um alelo da ApoE4, e ainda menor para aqueles que possuem dois alelos da ApoE4 (ver Patente dos E.U.A. No. 5,508,167). Assim, o prognóstico de um indivíduo para a AD é mais provável ser negativo se o indivíduo possuir um alelo da ApoE4 e ainda mais negativo se o indivíduo possuir mais do que um alelo da ApoE4. O prognóstico negativo pode ser observado em termos do aumento da probabilidade de desenvolver a doença, ou do início em idade precoce.

Outras doenças associadas a ApoE incluem a hiperlipidemia de Tipo III e a aterosclerose. Outra evidência indica que os polimorfismos no promotor da ApoE estão também associados ao risco aumentado da AD. Ver Lambert et al., Human Mol. Gen., Vol. 7, p. 533 (1998); e Lambert et al., Human Mol. Gen., Vol. 7, p. 1511 (1998).

Estudos demonstraram que os fragmentos da ApoE entre 5 - 22 kDa estão presentes no fluido espinal cerebral post mortem tanto nos pacientes de controlo como nos pacientes com AD. A única banda principal imunoprecipitada por um anticorpo monoclonal que reconhece o domínio tóxico putativo corre com um peso molecular aparente de cerca de 22 kDa. Este fragmento corresponde provavelmente ao principal produto da clivagem da trombina da ApoE, que se demonstrou ser resistente à protease. Ver Weisgraber et al., J. Biol. Chem., Vol. 258, pp. 12348 - 54 (1983).

Os aminoácidos 130 - 169 da ApoE humana englobam um domínio imunorregulatório com ambas as actividades citoestática e citotóxica contra as células T dependentes da interleucina-2. Esta descoberta é consistente com resultados de estudos anteriores que envolveram os resíduos 141 - 155 no efeito anti-proliferativo da ApoE em células T naïf activadas pelo mitogénio. Ver Cardin et al. (1988); e Dyer et al. (1991).

Tratamento de Demências

O tratamento de demências, incluindo a AD é multi-modal, à medida de cada indivíduo e modificado com a progressão da doença. O tratamento pode ser dividido em três áreas: intervenções farmacológicas, tendo como objectivo a patofisiologia específica da demência, se possível, e agentes farmacológicos que melhoram os sintomas específicos, tais como os delírios e as anomalias do sono, e intervenções comportamentais que podem melhorar os sintomas específicos e que melhoram as actividades do paciente no dia-a-dia.

Os objectivos de tratamento para a AD são: (1) *sintomáticos* - para melhorar o grau de deterioração cognitiva, incluindo os défices de atenção e a disfunção executiva, os sintomas comportamentais e a performance das actividades do dia-a-dia; e/ou (2) *modificação da doença* - retardar a progressão da doença e desta forma manter a função independente tanto quanto possível.

O único tratamento farmacológico bem sucedido da deterioração cognitiva de AD até à data foi os fármacos ChEI. Estes incluem; a tacrina, o donepezil, a rivastigmina e a galantamina. Ver Jacobsen, "Alzheimer's Disease: An Overview of Current and Emerging Therapeutic Strategies", Curr. Top. Med. Chem., Vol. 2, No. 4, pp. 343 - 352 (2002); e a Revista Giacobini, Ann. N. Y. Acad. Sci., Vol. 920, pp. 321 - 327 (2000).

Os ChEIs utilizados para o tratamento da AD são apresentados na Tabela 1 em baixo.

Tabela 1. ChEIs para o Tratamento da AD

1	Rivastigmina (EXELON™ ou ENA713)
2	Tacrina (COGNEX™)
3	Donepezil (ARICEPT™)
4	Huperzina-A
5	Metrifonato
6	Galantamina (REMINYL™)
7	Fisostigmina
8	Eptastigmina
9	Ibedenona
10	Zifrosilona
11	Quilostigmina

Os ChEIs são a única classe de agentes efectivos conhecidos contra a patofisiologia da doença e funcionam

através do aumento dos níveis da acetilcolina que se sabe diminuir nos cérebros dos pacientes com AD. Estes fármacos podem inibir apenas a acetilcolinesterase ou podem inibir tanto a acetil- como a butiril-ChE. A rivastigmina inibe efectivamente tanto a acetil- como a butiril-ChE e esta dupla inibição pode considerar-se uma das propriedades especiais destes fármacos.

Alguns destes fármacos ChEI demonstraram ser eficazes tanto na melhoria da extensão do défice cognitivo em pacientes com AD, como medido, por exemplo, pelos resultados da Escala de Avaliação da Doença de Alzheimer (ADAS), como na melhoria dos distúrbios neuropsiquiátricos de pacientes com AD, tal como a agitação, a deambulação, a agressividade, a apatia e a ansiedade. Adicionalmente, alguns dos fármacos inibidores da acetilcolinesterase (AChEI) são capazes de abrandar o processo de deterioração e assim estabilizar o processo da doença durante certos períodos de tempo. O mecanismo preciso pelo qual estes fármacos produzem todos os benefícios observados na AD não é totalmente conhecido e parece claro que eles fazem mais do que apenas produzir um aumento temporário na neurotransmissão colinérgica.

Em geral, os fármacos ChEI são eficazes em pacientes que possuem demências com défices colinérgicos, que incluem, mas não estão limitados a, à AD, à demência com corpos de Lewy e à Doença de Parkinson e à demência. Em geral, estes fármacos devem ser utilizados precocemente no decurso da demência, especialmente na AD.

O cérebro humano contém dois tipos principais de ChE, a AChE e a butirilcolinesterase (BuChE). O principal papel da AChE é o de terminar a transmissão do impulso em sinapses colinérgicas através da hidrólise rápida da acetilcolina (ACh). Ver Giacobini, *supra*.

Até muito recentemente, a AChE foi considerada como o alvo principal para o design dos fármacos e a contribuição relativa de BuChE para a regulação dos níveis de ACh foi em grande parte ignorada. No entanto, uma linha crescente de evidências indica que tanto a AChE como o BuChE desempenham papéis na regulação dos níveis da ACh e podem também ser importantes no desenvolvimento e na progressão da AD. Ver Greig et al., Curr. Med. Res. Opin., Vol. 17, No. 3, pp. 159 - 165 (2001).

Enquanto que todos os ChEIs partilham o efeito comum da inibição de AChE, a rivastigmina é um inibidor duplo tanto da AChE como do BuChE e tem demonstrado benefícios significativos e clinicamente relevantes para os pacientes com a AD. Ver Bar-On et al., "Kinetic and Structural Studies on the Interaction of Cholinesterases with the Anti-Alzheimer Drug Rivastigmine", Biochem., Vol. 41, No. 11, pp. 3555-3564 (2002). Adicionalmente, foi descoberto que pacientes que não respondem ao ou que não toleram o donepezil (ARICEPT™) muitas vezes respondem e/ou toleram o tratamento, quando trocado pela rivastigmina. Ver, Auriacombe et al., Current Medical Research Opinion, Vol. 18, pp. 129 - 138 (2002).

Apesar dos ChEIs serem fármacos bem sucedidos, apenas um subgrupo de pacientes com a AD beneficiam com eles. Ver Bums et al., *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, Vol. 10, No. 3, pp. 237 - 244 (1999); e Rosler et al., *BMJ*, Vol. 318, No. 7184, pp. 633 - 638 (1999). Em geral, pelo menos um terço dos pacientes não responde de todo ao tratamento com os ChEIs. Assim existe uma grande necessidade de estabelecer um método para predizer antes do tempo se um paciente responderá provavelmente a esta classe de fármacos de forma a evitar a exposição dos pacientes a um regime de fármacos se estes não beneficiarem com eles. Será de grande valor clínico se o perfil genético de um paciente puder ser utilizado para fornecer predições de resposta à terapia com ChEI. No entanto, os estudos anteriores do efeito do genótipo da ApoE na resposta aos ChEIs produziram resultados contraditórios. O fenótipo da ApoE4 demonstrou ser ou um prognóstico negativo ou não possuir nenhum efeito na eficácia do tratamento com a tacrina em pacientes com a AD. Ver Sjogren et al., *J. Neural. Transm.*, Vol. 108, No. 4, pp. 451 - 458 (2001); Farlow et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Vol. 802, pp. 101 -110 (1996); Farlow et al., *Neurology*, Vol. 50, No. 3, pp. 669 - 677 (1998); Rigaud et al., *Eur. J. Neurol.*, Vol. 7, No. 3, pp. 255 - 258 (2000); Poirier et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 92, No. 26, pp. 12260 - 12264 (1995); e MacGowan et al., *Int. J. Geriatr. Psychiatry*, Vol. 13, No. 9, pp. 625 - 630 (1998).

O fenótipo da ApoE4 demonstrou também não possuir

influência na eficácia do tratamento com a galantamina na AD. Ver Aerssens et al., *Geriatr. Cogn. Disord.*, Vol. 12, No. 2, pp. 69 - 77 (2001); e Wilcock et al., *BMJ*, Vol. 321, No. 7274, pp. 1445 -1449 (2000).

Nobile et al., *J. Nucl. Med.*, vol. 43 (8), p. 983 - 990 (2002) descreve que os genótipos da Apo E são comparáveis em pacientes estáveis e não estáveis tratados com a rivastigmina ou com o donepezil.

Todos os ChEIs podem causar efeitos secundários, tais como náuseas, vômitos, diarreia, insônia, câibras muscular, fadiga e anorexia. Estes efeitos secundários podem variar entre moderados a severos. Adicionalmente, nem todos os pacientes com a AD apresentam melhoras ou mesmo um abrandamento na taxa de deterioração quando tomam estes fármacos. Assim existe uma necessidade de métodos para a determinação de quais os pacientes que irão responder a um ChEI e quais os pacientes que irão desenvolver efeitos secundários adversos durante o tratamento.

Uma das variáveis de maior preocupação prática no cuidado dos pacientes com demência é estimar o nível de cuidados que o paciente poderá requerer no futuro. Por "nível de cuidado" entende-se a extensão e a intensidade de assistência externa e de monitorização que o paciente irá requerer para permanecer seguro, e para maximizar a qualidade de vida e de saúde.

A variação do nível de cuidados para pacientes com demência é enorme. A despesa dos níveis mais elevados de cuidados pode também ser bastante elevada. O nível pode variar entre; mínimo para pacientes com doença precoce e moderada que podem ainda ser totalmente autónomos e viver independentemente, a cuidados no domicílio de intensidade crescente, a institucionalização a vários níveis de restrição pessoal e intensidade de assistência de enfermagem. Em casos mais severos, em adição ao declínio cognitivo progressivo, ocorrem frequentemente problemas de comportamento severos. Estes problemas de comportamento incluem, mas não estão limitados a, depressão, agressividade, ou comportamento de deambulação repetidos e estes problemas de comportamento, bem como os problemas médicos simultâneos que frequentemente se desenvolvem nestes pacientes, podem requerer hospitalização do paciente extremamente dispendiosa em unidades médicas e/ou psiquiátricas.

É esperado que para qualquer paciente que sofra de demência os níveis de cuidados requeridos irão aumentar progressivamente ao longo do tempo. O decurso destas alterações é medido entre meses a anos. No entanto, a taxa e natureza deste aumento progressivo não pode ser predito com precisão devido às variações no processo da própria doença e mais importante devido à variação da resposta dos pacientes ao tratamento, especialmente ao tratamento com os ChEIs. Assim, existe uma necessidade, adicionalmente à anteriormente citada, de métodos para predizer ou estimar no futuro próximo o nível requerido de cuidados que um

paciente irá necessitar, por exemplo, em 6 meses, 1 ano, 3 anos ou mais. Tal predição irá ajudar no planeamento para maximizar a qualidade e minimizar a despesa de tais cuidados.

Sumário da Invenção

A presente invenção supera os problemas descritos acima fornecendo um método, como definido nas reivindicações, para predizer a receptividade dos pacientes com demência incluindo, mas não limitado à, DAT para o tratamento com fármacos ChEI com base numa determinação do genótipo da ApoE.

Um outro aspecto da invenção é um método para determinar a receptividade de um indivíduo com demência ao tratamento com rivastigmina compreendendo: determinar para cada uma de duas cópias do gene da ApoE presente no indivíduo, a natureza do genótipo da ApoE, em que se uma ou as duas cópias do gene da ApoE presente no indivíduo contêm o alelo de $\epsilon 4$, o paciente é então colocado num grupo de resposta positivo; ou se nenhuma das duas cópias do gene da ApoE do paciente contém o alelo de $\epsilon 4$ então o paciente é colocado num grupo de resposta negativo. Neste aspecto a demência é seleccionada a partir do grupo constituído pela; DAT, demência vascular, demência com corpos de Lewy, demência da doença de Parkinson, demência do Síndrome de Down e deterioração cognitiva moderada.

Breve Descrição das Figuras**Descrição Detalhada da Invenção**

A presente invenção fornece métodos para a determinação de quais os pacientes com demência incluindo, mas não limitados à, AD que responderão mais provavelmente ao tratamento com a rivastigmina com melhoria das funções cognitivas, melhoria nos problemas comportamentais ou na estabilização da deterioração clínica quer num ou em todos os grupos de sintomas. O termo "resposta ao tratamento" quando utilizado aqui pretende incluir ambos os efeitos profilático ou protector pelo que os sintomas da doença são quer impedidos de ocorrer ou impedidos de piorar durante um período de tempo e, adicionalmente um efeito pelo qual os sintomas que já eles próprios se manifestaram são melhorados ou reduzidos na intensidade, na severidade ou na duração.

Um aspecto adicional da invenção é um método para a determinação, antes do tempo, quão receptivo irá ser um paciente ao tratamento com a rivastigmina, compreendendo a determinação para as duas cópias do gene da ApoE presentes no paciente a natureza dos dois alelos. Se um ou ambos os genes possuírem a isoforma do alelo de $\epsilon 4$ então o paciente irá ser colocado num grupo de resposta positivo e será esperado que responda ao tratamento com os ChEIs, incluindo o tratamento com a rivastigmina em doses de 6 mg/dia ou mais elevadas. Se o alelo de $\epsilon 4$ não estiver presente em

qualquer das cópias do gene da ApoE então o paciente irá ser colocado num grupo de resposta negativa. A determinação da receptividade de um paciente ao tratamento com os ChEIs antes do tratamento em si terá importância na ajuda ao clínico para fornecer o regime de tratamento adequado para um paciente e para minimizar os efeitos secundários adversos.

Quando utilizado aqui, o termo "tratamento com 6 mg/dia ou mais de rivastigmina" deverá significar a administração a um paciente, por quaisquer meios, o equivalente molar de 6 mg ou mais de tartarato de rivastigmina (EXELON™) durante um período de 24 horas. O tartarato de rivastigmina (EXELON™) está comercialmente disponível através da Novartis Pharmaceutical Corporation, East Hanover, NJ. A rivastigmina pode ser administrada como uma única dose ou pode ser subdividida em qualquer número de pequenas doses separadas a serem administradas durante o período de 24 horas. A rivastigmina pode estar em qualquer forma farmacologicamente aceitável que permita a absorção pelo corpo, incluindo o sal de um ácido mineral ou orgânico e pode ser combinada ou formulada com quaisquer excipientes farmacologicamente aceitáveis. A administração pode ser feita através de qualquer via incluindo, mas não limitada à, oral, como uma solução aquosa ou quer por libertação imediata quer por libertação retardada, quer por libertação lenta; formulação farmacêutica oral; parentérica, incluindo através das vias intramuscular, intravenosa ou intratecal; intranasal; rectal; vaginal ou por absorção ou difusão

transcutânea, incluindo através de sistemas transdérmicos incluindo, mas não limitados ao, TRANSDERMAL SYSTEM PATCH™.

Características do Diagnóstico da Demência

Num paciente com um veredicto clínico sugerindo qualquer tipo de processo de demência, incluindo a AD, todas as outras causas dos sintomas devem ser excluídas pelo historial, pela examinação e pelos estudos laboratoriais apropriados. Em certos tipos de demência os estudos laboratoriais podem ser bastante úteis. Por exemplo, a avaliação do fluido espinal cerebral (CSF) para a proteína amilóide e para a proteína tau pode aumentar a probabilidade de um diagnóstico da AD, mas não é suficientemente específico para ser considerado rotineiro no rastreio ou no diagnóstico precoce da AD. As melhorias nestes testes em combinação com a imagem por ressonância magnética (MRI) quantitativa pode em último caso permitir precocemente, a avaliação específica. A presença do alelo da ApoE4 torna bastante provável que a demência do paciente seja gerada pela AD. A presença da ApoE4 está também associada com a demência vascular.

Quando utilizados aqui, os termos "AD e DAT" significam a mesma doença e são utilizados alternadamente.

As demências de todos os tipos incluem, mas não se limitam à, AD, resultam na deterioração progressiva das actividades do paciente e resultam em problemas

comportamentais de declínio constantes que coincidem com a deterioração das funções cognitivas e fazem parte do mesmo processo da doença. Os problemas comportamentais típicos apresentados pelos pacientes com demência incluem, mas não estão limitados à, depressão, psicose, delírio, distúrbio do sono, deambulação, acesso de raiva, agressividade, agitação, apatia, ansiedade, suspeição, pânico e paranóia. Nos estádios da maioria das formas de demência, incluindo a AD, as vítimas estão acamadas, sofrem de incontinência urinária e intestinal e sofrem ataques epilépticos. A morte deve-se normalmente à pneumonia ou às infecções do tracto urinário.

Enquanto que um diagnóstico definitivo de, por exemplo, AD requer o exame dos tecidos na autópsia ou através de biopsia, o diagnóstico pode ser efectuado com elevada precisão utilizando critérios clínicos. As manifestações clínicas da AD são normalmente características, os distúrbios da memória ocorrem precocemente na doença; os pacientes possuem dificuldade de aprendizagem e de relembrar matérias recentes. Também pode ocorrer precocemente a desorientação espacial e temporal, com os pacientes a ficarem perdidos nos ambientes familiares. A afasia, a apraxia e a acalculia desenvolvem-se à medida que a doença progride, e pode ocorrer a apatia ou a paranóia. Os pacientes apresentam muitas vezes delírios de roubo ou de infidelidade conjugal. Os pacientes podem vaguear, caminhar lentamente, abrir e fechar gavetas repetidamente, e repetir as mesmas questões. As anormalidades cíclicas da

vigília e do sono podem tornar-se evidentes; por exemplo, um paciente pode estar acordado à noite mas pensar que é de dia. As actividades do dia-a-dia declinam ao longo da doença. Os pacientes perdem a capacidade de comerem e de tratarem da sua higiene sozinhos e têm dificuldade em se vestir. Nas fases terminais da doença, os pacientes exibem deterioração cognitivo nas esferas virtual e intelectual, as anormalidades motoras tornam-se evidentes e desenvolvem-se ambas as incontinências urinárias e fecais.

A característica principal de qualquer demência é o desenvolvimento de múltiplos défices cognitivos que incluem a deterioração da memória e de pelo menos um dos seguintes distúrbios cognitivos: a afasia, a apraxia, a agnosia, ou um distúrbio no funcionamento executivo. Os défices cognitivos devem ser suficientemente severos para causar deterioração do funcionamento ocupacional ou social e podem representar um declínio a partir de um nível anterior mais elevado de funcionamento.

Um diagnóstico de uma demência não deve ser efectuado se os défices cognitivos ocorrerem exclusivamente durante o decurso de um delírio. No entanto, uma demência e um delírio podem ambos ser diagnosticados se a demência estiver presente em alturas em que o delírio não está presente. A demência pode estar etiologicamente relacionada a uma condição médica comum, à persistência dos efeitos da substância utilizada (incluindo a exposição a toxinas), ou a uma combinação destes factores.

A deterioração da memória é fundamental para efectuar o diagnóstico de uma demência e é um sintoma precoce proeminente (Critério A1). Os indivíduos com demência tornam-se diminuídos na sua capacidade de aprender novas matérias, ou esquecem matérias anteriormente aprendidas. A maioria dos indivíduos com demência possuem ambas as formas de deterioração da memória, apesar de ser por vezes difícil demonstrar a perda de matérias anteriormente aprendidas no início do decurso do distúrbio. Eles podem perder valores tal como carteiras e chaves, esquecerem-se da comida ao lume e perderem-se nas vizinhanças pouco conhecidas. Nos estádios avançados da demência, a deterioração da memória é tão severa que a pessoa se esquece da sua ocupação, da sua escolaridade, do seu aniversário, dos membros da família e por vezes do próprio nome.

A memória pode ser formalmente testada perguntando à pessoa para registar, reter, relembrar e reconhecer a informação, a capacidade de aprender novas informações pode ser avaliada pedindo ao indivíduo para ler uma lista de palavras. Ao indivíduo é pedido para repetir as palavras (registro), para relembrar a informação após um período de vários minutos (retenção, relembrar), e para reconhecer as palavras de entre uma lista múltipla (reconhecimento). Os indivíduos com dificuldade de aprendizagem de novas informações não são ajudados por pistas ou por dicas, por exemplo, questões de múltipla escolha, devido a estes não aprenderem o material inicialmente. Em contraste os

indivíduos com défices de recuperação primários podem ser ajudados por pistas e dicas devido à sua dificuldade estar na capacidade de aceder às suas memórias. A memória remota pode ser testada pedindo ao indivíduo para relembrar a informação pessoal ou o material passado que o indivíduo ache interessante, por exemplo, politica, desporto, entretenimento. É também útil para determinar (a partir do indivíduo e dos informadores) o impacto dos distúrbios da memória nas actividades do indivíduo, por exemplo, na capacidade para trabalhar, para fazer compras, para cozinhar, para pagar contas, para voltar a casa sem se perder.

A deterioração na função da linguagem (afasia) pode manifestar-se pela dificuldade de pronunciar os nomes de indivíduos ou de objectos (Critério A2a). O discurso dos indivíduos com afasia pode tornar-se vago ou vazio, com longas frases circunlocutórias e a utilização excessiva de termos de significado indefinido, tais como "coisa" e "isto". A compreensão da linguagem falada e escrita e a repetição da linguagem pode também estar comprometida. Nos estados avançadas da demência, os indivíduos podem tornar-se mudos ou possuírem um padrão de linguagem deteriorado caracterizado por ecolalia, isto é, ecoar o que se ouviu; ou palilalia, isto é, repetir sons ou palavras vezes sem conta. A linguagem é testada pedindo ao indivíduo para nomear objectos na sala, por exemplo, gravata, vestido, secretária, lâmpada; ou partes do corpo, por exemplo, nariz, queixo, ombro; seguir comandos, por exemplo, "aponte

para a porta e depois para a mesa"; ou repetir frases, por exemplo, "nada de ses, de is ou de mas".

Os indivíduos com demência podem exibir apraxia, isto é, diminuição da capacidade para executar actividades motoras apesar de possuírem as capacidades motoras intactas, a função sensorial e a compreensão da tarefa pretendida (Critério A2b). Eles estarão diminuídos na sua capacidade para pantomimar a utilização de objectos, por exemplo, para desembaraçar o cabelo; ou para efectuar acções motoras conhecidas; por exemplo, acenar. A apraxia pode contribuir para os défices no cozinhar, no vestir e no desenhar. Os distúrbios na capacidade motora podem ser testados pedindo ao indivíduo para executar funções motoras, por exemplo, para demonstrar como se lavam os dentes, para copiar pentágonos cruzados; para montar blocos ou para orientar tubos em padrões específicos.

Os indivíduos com demência podem exibir agnosia, isto é, falha no reconhecimento ou na identificação de objectos apesar de possuírem a função sensorial intacta (Critério A2c). Por exemplo, o indivíduo pode possuir acuidade visual normal mas não ter a capacidade para reconhecer objectos, tais como cadeiras ou canetas. Eventualmente eles serão incapazes de reconhecer membros da família ou mesmo o seu próprio reflexo no espelho. Similarmente, eles poderão possuir uma sensação táctil normal, mas serem incapazes de identificar objectos coloca-

dos nas suas mãos apenas pelo toque, isto é, uma moeda ou chaves.

Os distúrbios na função executiva são uma manifestação comum de demência (Critério A2d) e podem ser especialmente relacionados com os distúrbios do lóbulo frontal ou das vias subcorticais associadas. As funções executivas envolvem a capacidade de pensar abstractamente e de planejar, iniciar, sequenciar, monitorizar e de parar comportamentos complexos. A deterioração do pensamento abstracto pode ser manifestada na dificuldade do indivíduo em copiar novas tarefas e evitar situações que requerem o processamento de informações novas e complexas. A capacidade para o abstracto pode ser formalmente avaliada pedindo à pessoa para encontrar familiaridades ou diferenças entre palavras relacionadas. A disfunção executiva é também evidente numa capacidade reduzida para realizar jogos mentais, para criar novas informações verbais ou não verbais, e para executar actividades motoras sequenciais.

O teste para as funções executivas incluem pedir ao indivíduo para contar até 10, pronunciar o alfabeto, subtrair séries de 7, dizer o maior número de animais possíveis em um minuto, ou desenhar uma linha contínua constituída por emes e enes alternados. É também útil para a determinação (a partir do indivíduo e dos informadores) do impacto dos distúrbios nas funções executivas do dia-a-

dia do indivíduo, por exemplo, capacidade para trabalhar, para planear actividades, e para orçamentar os gastos.

Os itens tanto no Critério A1 (deterioração da memória) como no Critério A2 (afasia, apraxia, agnosia ou distúrbio da função executiva) devem ser suficientemente severos para causar o declínio significativo na função social ou ocupacional, por exemplo, ir à escola, ir trabalhar, ir fazer comprar, vestir, tomar banho, orientar as finanças e outras actividades do dia-a-dia; e devem representar um declínio a partir de um nível, prévio de funcionamento (Critério B). A natureza do grau de deterioração é variável e depende muitas vezes do nível social particular do indivíduo. O mesmo nível de deterioração cognitiva pode diminuir significativamente a capacidade de um indivíduo para efectuar um trabalho complexo, mas não para um trabalho que seja menos exigente. As escalas de avaliação estandardizadas publicadas que medem a manutenção física, por exemplo, a higiene pessoal, a função intelectual, e a capacidade para utilizar instrumentos ou ferramentas, por exemplo, o telefone, a máquina de lavar, podem ser utilizadas para medir a gravidade da deterioração.

A demência não é diagnosticada se estes sintomas ocorrerem exclusivamente durante o decurso de um delírio. No entanto, um delírio pode ser sobreposto a uma demência pré-existente, em cujo caso devem ser atribuídos ambos os diagnósticos.

Características e Distúrbios Associados

Características descritivas e distúrbios mentais associados

Os indivíduos com demência podem tornar-se especialmente desorientados e ter dificuldade em tarefas espaciais. As funções visuo-espaciais podem ser avaliadas pedindo ao indivíduo para copiar desenhos, tais como um círculo, pentágonos sobrepostos e um cubo. Uma avaliação fraca e um discernimento débil são comuns na demência. Os indivíduos podem exibir pouca ou nenhuma consciência da perda de memória ou de outras anormalidades cognitivas. Eles podem fazer julgamentos irrealistas das suas capacidades e efectuar planos que não são congruentes com os seus défices e prognósticos, por exemplo, planejar o arranque de um novo negócio. Eles podem subestimar os riscos envolvidos em actividades, por exemplo, na condução. Ocasionalmente, podem magoar os outros quando se tornam violentos. O comportamento suicida pode ocorrer, particularmente em estádios precoces quando o indivíduo é mais capaz de efectuar um plano ou uma acção. A demência é por vezes acompanhada por distúrbios motores na forma de andar o que pode levar a quedas.

Alguns indivíduos com demência apresentam um comportamento desinibido, incluindo proferirem piadas inapropriadas, negligenciarem a higiene pessoal, exibirem

excessiva familiaridade com estranhos, ou desrespeitarem as regras convencionais da conduta social. Pode ocorrer na demência o discurso pronunciado indistintamente que está associado à patologia subcortical, tal como na doença de Parkinson, na doença de Huntington e em alguns casos de demência vascular. As múltiplas deteriorações cognitivas da demência estão muitas vezes associadas com a ansiedade, e com os distúrbios de humor e do sono. Os delírios são comuns, especialmente aqueles que envolvem temas de perseguição, por exemplo, pensa que os objectos fora do sítio foram roubados. As alucinações podem ocorrer em todas as modalidades sensoriais, mas as alucinações visuais são as mais comuns. O delírio é frequentemente sobreposto à demência devido à doença cerebral subjacente poder aumentar a susceptibilidade a estados confusos que podem ser produzidos por medicamentos ou por outras condições médicas concorrentes comuns. Os indivíduos com demência podem ser especialmente vulneráveis ao stress físico, por exemplo, na doença ou em pequenas cirúrgicas; e ao stress psicológico, por exemplo, ir ao hospital, perder um ente querido; que podem exacerbar os seus défices intelectuais e outros problemas associados.

Descobertas laboratoriais associadas

Uma discussão de descobertas laboratoriais associadas que são específicas de tipos de demência está incluída no texto para cada demência. Invariavelmente

existem anormalidades no funcionamento cognitivo e da memória, que podem ser avaliadas utilizando exames do status mental e testes neurofisiológicos. A neuroimagem pode ajudar no diagnóstico diferencial da demência. A tomografia computadorizada (CT) ou a MRI pode revelar a atrofia cerebral, lesões cerebrais focais (enfartes corticais, tumores, hematomas subdurais), hidrocefalia ou lesão periventricular cerebral isquêmica. A imagiologia funcional, tal como a tomografia por emissão de positrões (PET) ou a tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) não é normalmente utilizada na avaliação da demência, mas pode fornecer informação de diagnóstico diferencial útil, por exemplo, alterações do lóbulo parietal na AD ou alterações do lóbulo frontal nas degenerações do lóbulo frontal; em indivíduos sem evidência de alterações estruturais em exames por CT ou por MRI.

Resultados de exames físicos associados e condições médicas comuns

Os resultados dos exames físicos associados à demência dependem da natureza, da localização e do estágio de progressão da patologia subjacente. A causa mais comum da demência é a AD, seguida pela doença vascular e depois por múltiplas etiologias. Outras causas de demência incluem a doença de Pick, a hidrocefalia de pressão normal, a doença de Parkinson, a doença de Huntington, a lesão cerebral traumática, os tumores cerebrais, a anoxia, os distúrbios infecciosos, por exemplo, o vírus da imunodeficiência.

ciência humana (HIV), a sífilis; a doença dos priões, por exemplo, a doença de Creutzfeldt-Jakob; as condições endócrinas, por exemplo, o hipotireoidismo, a hipercalcemia, a hipoglicémia; as deficiências nas vitaminas, por exemplo, a deficiência da tiamina, da niacina, da vitamina B12; os distúrbios imunes, por exemplo, a polimialgia reumática, o lúpus eritematoso sistémico; as condições hepáticas, as condições metabólicas, por exemplo, a doença de Kuf, a adrenoleucodistrofia, a leucodistrofia metacromática e outras doenças que afectam adultos e crianças; e outras condições neurológicas, por exemplo, a esclerose múltipla.

Critérios de Diagnóstico para a DAT

A. O desenvolvimento de défices cognitivos múltiplos manifestados tanto por:

(1) Deterioração da memória (deterioração da capacidade para aprender nova informação ou para relembrar informação anteriormente aprendida); e

(2) um (ou mais) dos seguintes distúrbios cognitivos:

(a) afasia (distúrbio da linguagem);

(b) apraxia (deterioração da capacidade de efectuar actividades motoras apesar da função motora permanecer intacta);

(c) agnosia (falha no reconhecimento ou na identificação de objectos apesar da função sensorial permanecer intacta); e/ou

(d) distúrbio do funcionamento executivo, isto é, planear, organizar, sequenciar, abstracção.

B. Os défices cognitivos nos Critério A1 e A2 provocam cada um a deterioração significativa na função social ou ocupacional e representam um declínio significativo a partir de um nível prévio de desempenho.

C. O decurso é caracterizado pelo início gradual e continuação do declínio cognitivo.

D. Os défices cognitivos do Critério A1 e A2 não se devem a qualquer um dos seguintes:

(1) outras condições do sistema nervoso central que causam défices progressivos na memória e na cognição, por exemplo, a doença cerebrovascular, a doença de Parkinson, a doença de Huntington, o hematoma subdural, a hidrocefalia de pressão normal, o tumor cerebral;

(2) condições sistémicas que são conhecidas por causar demência, por exemplo, o hipotireoidismo, a deficiência na vitamina B12 ou no ácido fólico, a deficiência

na niacina, a hipercalcemia, a neurosífilis, a infecção pelo HIV; ou

(3) condições induzidas por uma substância.

E. Os défices não ocorrem exclusivamente durante o decurso de um delírio.

F. O distúrbio não é melhor explicado através de outras doenças do Eixo I, por exemplo, a doença da depressão major ou a esquizofrenia

Números de código para a DAT (com base no tipo das características iniciais e pré-dominantes)

Com Início Precoce - se o início se der ao 65 anos de idade ou antes:

290.11 Com Delírio: se o delírio for sobreposto à demência.

290.12 Com Ilusões: se as ilusões forem característica predominante.

290.13 Com Humor Depressivo: se o humor depressivo (incluindo manifestações que se cruzam totalmente com o critério de sintomas para um Episódio de Depressão Major) for a característica predominante. Não é apresentado um diagnóstico separado de Distúrbio do Humor Devido a uma Condição Médica Comum.

290.10 Sem Complicação: se nenhum dos acima citados predominar na apresentação clínica actual.

Com Início Tardio - se o início se der após os 65 anos de idade:

290.3 Com Delírio: se o delírio for sobreposto à demência.

290.20 Com Ilusões: se as ilusões forem característica predominante.

290.21 Com Humor Depressivo: se o humor depressivo (incluindo manifestações que se cruzam totalmente com o critério de sintomas para um Episódio de Depressão Major) for a característica predominante. Não é apresentado um diagnóstico separado de Distúrbio do Humor Devido a uma Condição Médica Comum.

290.0 Sem Complicação: se nenhum dos acima mencionados predominar na apresentação clínica actual.

Especificar se:

Com Distúrbios Comportamentais

Ver "Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders", 4th Edition (DSM-IV), American Psychiatric Association, Washington, DC (1994).

A Avaliação da Severidade das Demências

O grau de severidade dos sintomas na demência pode ser avaliado por um clínico treinado através de um exame clínico. Para ajudar nesta avaliação e para permitir uma classificação estandardizada e quantitativa pode ser

utiliza uma variedade de escalas de avaliação clínica. As escalas normalmente utilizadas normalmente pelos clínicos para avaliar a cognição incluem, mas não estão limitadas ao, Mini-Exame do Estado Mental, à Escala de Severidade dos Sintomas da Demência e à ADAS. A PDS - Escala de Deterioração Progressiva, a ADCS-ADL, e a DAD avaliam a performance das actividades do dia-a-dia. O Inventário Neuropsiquiátrico (NPI) e o BEHAVE-AD avaliam o comportamento. O CIBIC - PLUS e o CGIC são avaliadores do funcionamento global.

A ADAS

Para a pesquisa na AD e nas intervenções terapêuticas e avaliações clínicas potenciais uma avaliação estandardizada comumente utilizada que pode ser utilizada para medir especificamente a severidade das disfunções maior nos comportamentos cognitivo e não cognitivo característicos dos pacientes que sofrem da AD é a ADAS.

A ADAS de 21 itens é uma escalada baseada na performance que inclui 11 itens para avaliar a função cognitiva, por exemplo, a memória e a orientação (ADAS-Cog), e 10 itens para avaliar a função não cognitiva, por exemplo, o estado do humor e as alterações comportamentais (ADAS-Noncog) (Tabela 2). É possível obter um valor entre 0 e 70 na parte cognitiva da escala, em que 0 significa que o paciente não efectuou qualquer erro e 70 significa que o paciente é profundamente demente. Na prática, no entanto,

um indivíduo saudável obterá provavelmente um valor entre 5 e 10. Assim a escala engloba claramente a totalidade do intervalo cognitivo desde o valor normal até à demência terminal. Ver Rosen et al., Amer. J. Psych., Vol. 141, pp. 1356 - 1364 (1984).

Tabela 2. Estrutura da ADAS

Área de Sintoma	Número de itens	Número de pontos
Total	11	70
cognitivo		
Memória	3	27
Orientação	1	8
Linguagem	5	25
Práxis	2	10
Total não	10	50
cognitivo		

Os 11 itens cognitivos incluem a capacidade da linguagem falada, a compreensão da linguagem falada, relembrar as instruções de teste, a dificuldade em encontrar palavras no discurso espontâneo, seguir comandos, nomear objectos e dedos, a práxis estrutural, a práxis ideativa, a orientação, as tarefas de relembrar palavras e as tarefas de reconhecer palavras. A tarefa de relembrar palavras é colocada primeiramente e depois os 10 minutos que se seguem são passados numa conversa ilimitada de forma a avaliar os vários outros aspectos da linguagem. São seguidamente colocadas as restantes tarefas cognitivas.

Tabela 3. Itens Característicos da ADAS

	Pontuação Máxi- ma Potencial
ADAS-Cog (porção cognitiva da ADAS)	
Relembrar palavras	10
Orientação	8
Prática ideativa	5
Desenhar	5
Comandos	5
Nomear	5
Reconhecimento de palavras	12
Relembrar as instruções de teste	5
Expressão da linguagem	5
Compreensão da linguagem	5
Dificuldade em encontrar palavras	5
ADAS-Noncog (porção não cognitiva da ADAS)	
Tremores	5
Forma de andar	5
Agitação motora	5
Tristeza	5
Depressão	5
Ilusão	5
Alucinação	5
Apetite	5
Concentração	5
Não cooperação	5

EXEMPLO 1

Foi realizado um estudo farmacogenético do efeito do genótipo da ApoE ϵ 4 de um paciente na resposta ao ChEI, a rivastigmina. O tartarato de rivastigmina é um inibidor tanto da AChE como da BuChE e está comercialmente disponível sob o nome EXELON™ da Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, NJ. Os indivíduos no ensaio foram divididos em grupos de tratamento dependendo da dose que receberam, nomeadamente < 6 mg/dia de rivastigmina, 6 - 12 mg/dia de rivastigmina e placebo. Cada grupo de tratamento foi analisado separadamente. Os indivíduos em cada grupo de tratamento foram seguidamente classificados como portadores ou não portadores da ApoE ϵ 4 com base nos dados do genótipo. Foi encontrada uma associação significativa ($P = 0,0071$) entre os portadores da ApoE ϵ 4 e uma melhoria maior do que 4 pontos no grupo de 6 - 12 mg. Em contraste, no estudo a associação do alelo da ApoE ϵ 4 com a não deterioração não foi significativa ($P = 0,1172$) no mesmo grupo. Foi observada uma resposta ao tratamento em 65% dos portadores da ApoE ϵ 4, comparada com 48,7% dos não portadores da ApoE ϵ 4 quando tratados com uma dose de rivastigmina que era maior do que ou igual a 6 mg (Tabela 7).

Os dados foram também analisados para determinar se existiam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos dentro dos portadores e não portadores da ApoE ϵ 4. Foram encontradas diferenças altamente significativas entre os três grupos de tratamento nos portadores da ApoE ϵ 4 (não deterioração $P = 0,00000151$, melhoria em 4 pontos $P =$

0,00000175), mas não nos não portadores da ApoE ϵ 4 (não deterioração $P = 0,1137$, melhoria em 4 pontos $P = 0,7916$). Entre os não portadores da ApoE ϵ 4 existe uma diferença estatisticamente significativa ($P = 0,0434$) que indica que os não portadores da ApoE ϵ 4 respondem ao tratamento com a rivastigmina mas os níveis de resposta não são tão drásticos como nos portadores da ApoE ϵ 4 (Tabela 6). Não existe uma tendência ($P = 0,7106$) na resposta com o critério de melhoria em 4 pontos para os não portadores da ApoE.

A associação da alteração a partir valor de base da ADAS-Cog com o alelo da ApoE ϵ 4 é significativa ($P = 0,0357$) no grupo de 6 - 12 mg. Não foi encontrada nenhuma associação significativa nos outros grupos de tratamento. A média de alteração a partir do valor de base da ADAS-Cog nos indivíduos portadores do alelo da ApoE ϵ 4 é de - 1,72 em comparação com 0,335 dos não portadores de ϵ 4 quando tratados com ≥ 6 mg/dia de rivastigmina. Isto indica que os portadores de ϵ 4 são os que melhor respondem ao tratamento com a rivastigmina.

Métodos

Amostras

Os ensaios clínicos de Fase III ENA 713 B352 e ENA 713 B351 são estudos multicêntricos, em dupla ocultação, controlado por placebo, com grupos paralelos para verificar o efeito da rivastigmina em pacientes externos com provável AD. Ambos os ensaios são conduzidos

durante um período de 26 semanas. O ENA 713 B351 apresenta 4 vias de tratamento que compreendem 3 mg/dia de rivastigmina, 6 mg/dia de rivastigmina, 9 mg/dia de rivastigmina ou placebo. A fase inicial da titulação das doses (Semanas 1 - 12) foi seguida por uma fase de dose fixa (Semana 13 - 26), por um período total de 26 semanas de tratamento aleatório em dupla ocultação. O ENA 713 B352 apresenta 3 vias de tratamento que compreendem 1 - 4 mg/dia de rivastigmina, 6 - 12 mg/dia de rivastigmina, e placebo. A fase inicial da titulação das doses (Semanas 1 - 7) foi seguida por uma fase de dose fixa (Semana 8 - 26), por um período total de 26 semanas de tratamento aleatório em dupla ocultação. As amostras de sangue foram manuseadas pelo Roskamp Institute, University of South Florida.

Genotipagem

A genotipagem para os polimorfismos da ApoE foi efectuada pelo Roskamp Institute, University of South Florida. O método de genotipagem utilizado empregou a PCR em um passo como descrito em; Wenham PR, et al., Lancet. 1991 May 11; 337 (8750): 1158 - 9. Os polimorfismos da ApoE encontram-se sumarizados na Tabela 4.

Tabela 4. Classificação do Genótipo da ApoE com Base na Alteração de Aminoácidos na Sequência da ApoE

Classificação da ApoE	Posição do Aminoácido 112	Posição do Aminoácido 158
$\epsilon 2$	Cis	Cis
$\epsilon 3$	Cis	Arg
$\epsilon 4$	Arg	Arg

Análise EstatísticaMelhoria de 4 pontos na reposta

Os indivíduos nos ensaios foram classificados como sendo respondentes se a alteração final em relação ao seu valor de base da ADAS-Cog for menor ou igual do que - 4 pontos. O teste Exacto de Fisher foi utilizado para encontrar uma associação entre o genótipo da ApoE e a resposta.

Não deterioração na ADAS-Cog

Os indivíduos nos ensaios foram classificados como sendo respondentes se a alteração final em relação ao seu valor de base da ADAS-Cog for menor ou igual do que 0 pontos. O teste Exacto de Fisher foi utilizado para encontrar uma associação entre o genótipo da ApoE e a resposta.

Foram também analisadas as diferenças no tratamento dos portadores e dos não portadores da ApoE ε4. Sendo medidas as diferenças de tratamento nas classes de decréscimo de 4 pontos e nas de não deterioração. Um teste exacto de Cochran-Armitage para tendências é utilizado para determinar se o número de respondentes aumenta com a dose de rivastigmina entre cada grupo de genótipos.

A população ensaiada foi dividida em três grupos com base no tratamento que recebiam. Os três grupos eram o do placebo, o da rivastigmina < 6 mg/dia e o da rivastigmina $\geq$ 6 mg/dia. Todas as análises foram realizadas em cada grupo separadamente. Os dados do genótipo para a ApoE foram recodificados quanto à presença ou à ausência do alelo de ϵ 4. Os dados do genótipo recodificados foram utilizados como a variável categórica. Os valores recodificados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Reclassificação do Genótipo da ApoE

Genótipo da ApoE	Genótipo Recodificado
ϵ 2 / ϵ 3	Não portador de ϵ 4
ϵ 3 / ϵ 3	
ϵ 2 / ϵ 4	Portador de ϵ 4
ϵ 3 / ϵ 4	
ϵ 4 / ϵ 4	

Foi utilizado um modelo não paramétrico da análise de variância (ANOVA) para a análise. As alterações em relação aos valores de base da ADAS-Cog foram utilizadas como a variável dependente.

Quando utilizados aqui os termos " ϵ 2, ϵ 3 e ϵ 4" e "E2, E3, e E4" respectivamente, são utilizados alternadamente.

Adicionalmente aos estudos de associação realizados, foi analisada a representação demográfica

(idade, sexo e raça) na população genotipada para verificar a existência de qualquer sob ou sub representação da população nos vários grupos de genótipo e de tratamento, ver Tabela 11. As diferenças, se as houver, são também verificadas na demografia entre a população genotipada e a não genotipada, ver Tabela 12.

Resultados

O resultado é altamente significativo ($P = 0,0071$) para o grupo de melhoria de 4 pontos no grupo de tratamento com uma dose ≥ 6 mg/dia de rivastigmina, como se pode observar na Tabela 6. Não se verifica nenhum efeito de genótipo significativo para os grupos do placebo ou de rivastigmina < 6 mg/dia como se pode observar na Tabela 6.

Tabela 6. Comparação da Resposta ao Tratamento (como medido pela melhoria de 4 ou mais pontos no valor de ADAS-Cog, entre os portadores e os não portadores do alelo $\epsilon 4$ da ApoE, entre os diferentes grupos de tratamento)

	Placebo		rivastigmina < 6 mg/dia		rivastigmina ≥ 6 mg/dia	
	Sem o alelo de $\epsilon 4$	Alelo de $\epsilon 4$	Sem o alelo de $\epsilon 4$	Alelo de $\epsilon 4$	Sem o alelo de $\epsilon 4$	Alelo de $\epsilon 4$
Sem melhoria de 4 pontos	41	69	32	83	37	54
Melhoria de 4 pontos	3	2	4	12	4	26
Valor de P	0,3691		1		0,0071	

No estudo da não deterioração, o genótipo (ApoE

$\epsilon 4$ vs. sem ApoE $\epsilon 4$) não parece ter um efeito significativo ($P = 0,1172$) na resposta ao tratamento. Não são observados efeitos do genótipo nos pacientes tratados com a rivastigmina < 6 mg/dia ou com o placebo como demonstrado na Tabela 7.

Tabela 7. Comparação da Resposta ao Tratamento (como medido pela não deterioração no valor de ADAS-Cog, entre os portadores e os não portadores do alelo $\epsilon 4$ da ApoE, entre os diferentes grupos de tratamento)

Resposta ao Tratamento	Placebo		rivastigmina < 6 mg/dia		rivastigmina ≥ 6 mg/dia	
	Sem o alelo de $\epsilon 4$	Alelo de $\epsilon 4$	Sem o alelo de $\epsilon 4$	Alelo de $\epsilon 4$	Sem o alelo de $\epsilon 4$	Alelo de $\epsilon 4$
Deterioração	32	52	24	63	21	28
Não deterioração	12	19	12	32	20	52
Valor de P	1		1		0,1172	

Olhando para as Tabelas 8 e 9 é evidente que os portadores do alelo $\epsilon 4$ da ApoE exibem uma taxa de resposta muito maior, especialmente quando se administra pelo menos 6 mg/dia de rivastigmina. Isto é especialmente válido no critério da não deterioração. Por outro lado, entre os não portadores da ApoE $\epsilon 4$ não existem diferenças significantes entre os três grupos de tratamento.

Uma diferença na resposta ao tratamento como medida pela melhoria de 4 pontos no critério da escala de ADAS-Cog, entre os portadores da ApoE $\epsilon 4$ foi tida como sendo significativa ($P = 0,00000175$) como apresentado na Tabela 8.

Tabela 8. Comparação da Resposta ao Tratamento (como medido pelo critério de melhoria de 4 pontos na ADAS-Cog, entre os diferentes grupos de tratamento de entre os portadores e os não portadores da ApoE ε4)

Resposta ao Tratamento	Portadores da ApoE ε4			Não Portadores da ApoE ε4		
	Placebo	rivastigmina < 6 mg/dia	rivastigmina ≥ 6 mg/dia	Placebo	rivastigmina < 6 mg/dia	rivastigmina ≥ 6 mg/dia
Sem melhoria de 4 pontos	69	83	54	83	37	54
Melhoria de 4 pontos	2	12	26	12	4	26
Valor de P		0,00000175			0,7916	

Uma diferença na resposta ao tratamento como medida pelo critério da não deterioração, entre os portadores da ApoE ε4 foi tida também como sendo muito significativa (P = 0,00000151) como apresentado na Tabela 9.

Tabela 9. Comparação da Resposta ao Tratamento (como medido pela não deterioração no valor da ADAS-Cog, entre os diferentes grupos de tratamento de entre os portadores e os não portadores da ApoE ε4)

Resposta ao Tratamento	Portadores da ApoE ε4			Não Portadores da ApoE ε4		
	Placebo	rivastigmina < 6 mg/dia	rivastigmina ≥ 6 mg/dia	Placebo	rivastigmina < 6 mg/dia	rivastigmina ≥ 6 mg/dia
Deterioração	52	63	28	32	24	21
Não deterioração	19	12	52	12	12	20
Valor de P		0,00000151			0,1137	

O modelo de ANOVA não paramétrico contém um resultado significativo (P = 0,0357) indicando os portadores

da ApoE $\epsilon 4$ que respondem melhor ao tratamento com a rivastigmina em comparação com os não portadores do alelo da ApoE $\epsilon 4$ quando tratados com uma dose diária que é de 6 mg/dia ou superior. Os resultados do modelo de ANOVA não paramétrico estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Resultados do Modelo de ANOVA Não Paramétrico (representa a alteração do valor de base na ADAS.Cog no final do estudo)

Portadores da ApoE $\epsilon 4$	Placebo	Rivastigmina < 6 mg/dia	Rivastigmina ≥ 6 mg/dia
Alelo de $\epsilon 4$	3,15	1,293	- 1,74
Sem o alelo de $\epsilon 4$	4,61	1,444	0,39
Valor de P	0,5844	0,4845	0,0357

Como pode ser observado na Tabela 10, os portadores do alelo de $\epsilon 4$ no grupo de dosagem ≥ 6 mg apresentam uma redução do seu valor da ADAS-Cog (- 1,74). Enquanto que para os não portadores de $\epsilon 4$ a alteração em relação ao valor de base é mínima (0,39). O efeito do genótipo não é observado no grupo de menor dose ou no grupo do placebo, indicando que efeito do genótipo depende da dosagem da rivastigmina.

Não existem diferenças significantes entre a informação demográfica das populações genotipadas e das não genotipadas como observado na Tabela 11. As frequências dos genótipos da ApoE $\epsilon 4$ e a sua distribuição entre os diferentes tratamentos são também observadas na Tabela 12.

Tabela 11. Informação Demográfica das Populações Genotipadas e Não Genotipadas

ApoE	Raça				Sexo		Idade (SD)
	Branca	Negra	Asiática/Oriental	Outras	Masculino	Feminino	
Não genotipada	926	75	4	19	410	614	74,4 (8,04)
Genotipada	363	8	2	5	174	204	74,03 (7,6)

Distribuição dos indivíduos genotipados e não genotipados nos vários grupos de tratamento:

Estado do Genótipo	Placebo	0 - 6 mg / dia	6 - 12 mg/dia
Não genotipado	293 (28,61%) *	275 (26,86%) *	456 (44,53%) *
Genotipado	116 (30,69%) *	134 (35,45%) *	128 (33,87%) *

* Os números entre parênteses indicam a percentagem de população total.

Tabela 12. Informação Demográfica nos Diferentes Grupos de Genótipo

ApoE	Raça				Sexo		Idade Média (SD)	Classificação da ApoE ε4
	Branca	Negra	Asiática/Oriental	Outras	Masculino	Feminino		
ε2/ε3	15	1	0	0	12	4	76,4 (10,8)	Sem ε4 (121) *
ε3/ε3	102	2	0	1	52	53	73,9 (9,0)	
ε2/ε4	13	1	0	0	6	8	74,4 (7,6)	ε4 (246) *
ε3/ε4	169	2	2	2	79	96	74,4 (6,9)	
ε4/ε4	53	2	0	2	20	37	72,5 (5,4)	

Distribuição do estado do portador da ApoE ε4 entre os diferentes grupos de tratamento:

Estado do Genótipo	Placebo	0 - 6 mg / dia*	6 - 12 mg/dia
Portadores da ApoE ε4	71	95	80
Não Portadores da ApoE ε4	44	36	41

* Os números entre parênteses indicam o número de indivíduos nessa categoria.

* As doses de 0 e de 6 mg não estão incluídas nesta categoria.

Métodos de Genotipagem

Os fenótipos e os genótipos da ApoE estão bem descritos e são conhecidos na área. O sistema de nomenclatura estabelecido bem como os fenótipos e os genótipos para a ApoE, estão descritos em, por exemplo, Zannis et al., J. Lipid. Res., Vol. 23, p. 911 et seq. (1982), que está aqui incorporado por referência. Ver Patente dos E. U. A. No. 5,508,167.

O passo para deter a presença ou a ausência da ApoE4 ou de DNA que codifica a tal isoforma (incluindo o número de alelos para a ApoE4) pode ser efectuado quer directa quer indirectamente através de qualquer forma adequada. Uma variedade de técnicas é conhecida pelos peritos na área. Envolvem todas normalmente o passo de recolher uma amostra de material biológico contendo quer o DNA quer a ApoE do indivíduo, e detectar seguidamente se o indivíduo possui ou não a ApoE4 ou o DNA que codifica tal isoforma a partir dessa amostra. Por exemplo, o passo para a detecção pode ser efectuado através da recolha de uma amostra da ApoE do indivíduo (por exemplo, do fluido espinal cerebral, ou de qualquer outro fluido ou tecido que contenha a ApoE), e seguidamente determinar a presença ou a ausência de uma isoforma da ApoE4 na amostra da ApoE (por exemplo, através da focagem isoeléctrica ou através de imunoensaios).

O isolamento e a caracterização da ApoE são descritos, por exemplo, em Rall et al., *Methods in Enzymology*, Vol. 128, pp. 273 - 287 (1986); Davignon et al., *Arteriosclerosis*, Vol. 8, pp. 1 - 21 (1988); e em Warnick et al., *Clin. Chem.*, Vol. 25, pp. 279 - 284 (1979). A focagem isoelétrica é uma técnica electroforética pela qual as moléculas são separadas com base nos seus pontos isoelétricos (pI) ao longo de um gradiente de pH contínuo. As proteínas de referência, comercialmente disponíveis (por exemplo, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) são utilizadas para indicar um gradiente ao longo do qual as proteínas da amostra se dispõem de acordo com o sítio onde o seu pH se iguala ao seu pI. Em Warnick et al. as apões de muito baixa densidade são isoladas a partir de amostras de plasma e aplicadas em géis de focagem isoelétrica e são obtidos os padrões de focagem isoelétricos das isoformas da ApoE. De acordo com o procedimento de Warnick et al., os valores do pI das isoformas da ApoE, E2, E3 e E4, são de cerca de 5,9; 6,0 e de 6,1; respectivamente, em ureia a 8 M a 4 °C. Ver também Pagnan et al., *J. Lipid. Res.*, Vol. 18, pp. 613 - 622 (1977); e Utermann et al., *FEBS Lett.*, Vol. 56, pp. 352 - 355 (1975).

Várias técnicas do tipo focagem isoelétrica são também fornecidas em Rall et al., *supra*, incluindo a focagem isoelétrica analítica, o tratamento com ciste-amina, o tratamento com a neuraminidase, a electroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio, bem como a análises de aminoácidos e a análise da

sequências dos ácidos nucleicos, e a focagem isoelétrica capilar é descrita em Swartz, *Biotechnology*, Vol. 12, pp. 408 - 409 (1994).

Em alternativa o passo de detecção pode ser efectuado através da recolha de uma amostra biológica contendo o DNA do paciente e seguidamente determinar a presença ou a ausência de DNA que codifica uma isoforma da ApoE4 na amostra biológica. Qualquer amostra biológica que contenha o DNA desse indivíduo pode ser utilizada, incluindo as amostras de tecido e as amostras de sangue, com as células sanguíneas a serem uma fonte particularmente conveniente. As sequências de aminoácidos e as sequências do ácido nucleico para a ApoE2, para a ApoE3 e para a ApoE4 são conhecidas e descritas. Ver, por exemplo, Paik et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 82, pp. 3445 - 3449 (1985), aqui incorporado por referência, para as sequências do ácido nucleico da ApoE3 e da ApoE4, e Mahley (1988), *supra*, para a informação da sequência de aminoácidos.

A determinação da presença ou da ausência do DNA que codifica uma isoforma da ApoE4 pode ser efectuada como um sonda de oligonucleótidos marcada com um grupo de detecção adequado, ou sob a forma de uma reacção de amplificação, tal como uma reacção de polimerização em cadeia (PCR), ou uma reacção de ligase em cadeia (LCR) (o produto de cada reacção de amplificação pode ser seguidamente detectado com uma sonda de oligonucleótidos marcada ou através de um número de outras técnicas).

Adicionalmente, o passo da detecção pode incluir o passo para detectar quer se o indivíduo é heterozigótico quer se é homozigótico para o gene que codifica uma isoforma da ApoE4. São conhecidos numerosos formatos diferentes de ensaios com sondas de oligonucleótidos que podem ser empregues para efectuar a presente invenção. Ver, por exemplo, a Patente dos E. U. A. No. 4,302,204 de Wahl et al.; a Patente dos E. U. A. No. 4,358,535 de Falkow et al.; a Patente dos E. U. A. No. 4,563,419 de Ranki et al.; e a Patente dos E. U. A. No. 4,994,373 de Stavrianopoulos et al.

A amplificação de uma sequência de ácido nucleico seleccionada, ou alvo pode ser efectuada por quaisquer meios adequados. Ver, normalmente, Kwoh et al., Am. Biotechnol. Lab., Vol. 8, pp. 14 - 25 (1990). Os exemplos de técnicas de amplificação adequadas incluem, mas não estão limitadas à, PCR, à LCR, à amplificação por deslocamento da cadeia (ver, normalmente, Walker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 89, pp. 392 - 396 (1992); e Walker et al., Nuc. Acids Res., Vol. 20, pp. 1691 -1696 (1992)); à amplificação com base na transcrição (ver Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86, pp. 1173 - 1177 (1989)); à replicação da sequência auto-sustentável (3SR) (ver Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 87, pp. 1874 - 1878 (1990)); ao sistema da Q.beta replicase (ver Lizardi et al., Bio Technology, Vol. 6, pp. 1197 - 1202 (1988)); à amplificação com base na sequência do ácido nucleico (NASBA) (ver Lewis, Genetic Engineering

News, Vol. 12, No. 9, p. 1 (1992)); a reacção de reparação da cadeia (RCR) (ver Lewis, *supra*); e amplificação do DNA boomerang (BDA) (ver Lewis, *supra*). A PCR é normalmente preferida.

As técnicas de amplificação do DNA tais como as precedentes podem envolver a utilização de uma sonda, um par de sondas, ou dois pares de sondas que se ligam especificamente ao DNA que codifica a ApoE4, mas que não se ligam ao DNA que codifica a ApoE2 ou a ApoE3 sob as mesmas condições de hibridização, e que servem de iniciador ou de iniciadores para a amplificação do DNA da ApoE4 ou de uma porção daí resultante na reacção de amplificação (da mesma forma, pode utilizar-se uma sonda, um par de sondas ou dois pares de sondas que se ligam especificamente ao DNA que codifica a ApoE2, mas que não se ligam ao DNA que codifica a ApoE3 ou a ApoE4 sob as mesmas condições de hibridização, e que servem de iniciador ou de iniciadores para a amplificação do DNA da ApoE2 ou de uma porção daí resultante na reacção de amplificação); e pode utilizar-se uma sonda, um par de sondas ou dois pares de sondas que se ligam especificamente ao DNA que codifica a ApoE3, mas que não se ligam ao DNA que codifica a ApoE2 ou a ApoE4 sob as mesmas condições de hibridização, e que servem de iniciador ou de iniciadores para a amplificação do DNA da ApoE3 ou de uma porção daí resultante na reacção de amplificação).

Em geral, uma sonda de oligonucleótidos que é utilizada para detectar o DNA que codifica a ApoE4 é uma

sonda de oligonucleótidos que se liga a um DNA que codifica a ApoE4, mas que não se liga a um DNA que codifica a ApoE2 ou a ApoE3 sob as mesmas condições de hibridização. A sonda de oligonucleótidos é marcada com um grupo de detecção adequado, tal como os descritos em baixo em conexão com os anticorpos. Do mesmo modo, uma sonda de oligonucleótidos que é utilizada para detectar o DNA que codifica a ApoE2 é uma sonda de oligonucleótidos que se liga a um DNA que codifica a ApoE2 mas que não se liga a um DNA que codifica a ApoE3 ou a ApoE4 sob as mesmas condições de hibridização, e uma sonda de oligonucleótidos que é utilizada para detectar o DNA que codifica a ApoE3 é uma sonda de oligonucleótidos que se liga a um DNA que codifica a ApoE3, mas que não se liga a um DNA que codifica a ApoE2 ou a ApoE3 sob as mesmas condições de hibridização.

A PCR pode ser efectuada de acordo com técnicas conhecidas. Ver, por exemplo, Patente dos E. U. A. Nos. 4,683,195; 4,683,202; 4,800,159; e 4,965,188. Em geral, a PCR envolve, primeiramente, o tratamento de uma amostra de ácido nucleico (por exemplo, na presença de uma polimerase do DNA termicamente estável) com um iniciador de oligonucleótidos para cada cadeia da sequência específica a ser detectada sob condições de hibridização tal que seja sintetizado um produto de elongação para cada iniciador e que seja complementar para cada cadeia de ácido nucleico, com os iniciadores suficientemente complementares para cada cadeia da sequência específica a ser hibridizada com eles tal que o produto de elongação sintetizado a partir de cada

iniciador, quando se encontra separado do seu complemento, possa servir como um molde para a síntese do produto de elongação do outro iniciador, e assim tratar a amostra sob condições desnaturantes para separar os produtos de elongação dos iniciadores dos seus moldes se a sequência ou as sequências a serem detectadas estiverem presentes. Estes passos são ciclicamente repetidos até se obter o grau de amplificação desejado. A detecção da sequência amplificada pode ser efectuada através da adição ao produto de reacção de uma sonda de oligonucleótidos capaz de se hibridizar com o produto de reacção, em que a sonda contém um marcador de detecção, e seguidamente detectar o marcador de acordo com técnicas conhecidas, ou através da visualização directa num gel.

Quando as condições de PCR permitem a amplificação de todos os tipos alélicos da ApoE, os tipos podem ser distinguidos através da hibridização com uma sonda alélica específica, através da digestão com endonucleases de restrição, através da electroforese em géis de gradiente desnaturante, ou através de outras técnicas. Está descrito um protocolo da PCR para determinar o genótipo da ApoE em Wenham et al., The Lancet, Vol. 337, pp. 1158 - 1159 (1991). Os exemplos de iniciadores efectivos para a amplificação e a identificação das isoformas da ApoE são aqui descritos. Os iniciadores específicos para a região polimórfica da ApoE (quer da ApoE4, quer da E3 ou da E2) podem ser utilizados. Em Wenham, por exemplo, os iniciadores da PCR são empregues para amplificar uma região

de DNA de 227 pb que abrange os sítios polimórficos da ApoE (os codões 112 e 158, que contêm os nucleótidos 3745 e 3883). Os fragmentos amplificados são então sujeitos à endonuclease de restrição CfoI que fornece diferentes fragmentos de restrição a partir dos seis possíveis genótipos da ApoE que podem ser reconhecíveis num gel de electroforese (ver, também Hixon et al., J. Lipid Res., Vol. 31, pp. 545 - 548 (1990); Houlston et al., Hum. Genet., Vol. 83, pp. 364 - 365 (1989); Wenham et al., Clin. Chem., Vol. 37, pp. 241 - 244 (1991); e Konrula et al., Vol. 36, pp. 2087 - 2092 (1990) para métodos adicionais).

Para um método melhorado e particularmente preferido de genotipar os polimorfismos da ApoE através da utilização de um ensaio com base na PCR com uma utilização simultânea de duas enzimas de restrição distintas. Ver Zivelin et al., Clin. Chem., Vol. 43, No. 9, pp. 1657 - 1659 (1997).

A LCR é também efectuada de acordo com técnicas conhecidas. Ver, por exemplo, Weiss, Science, Vol. 254, p. 1292 (1991). Em geral a reacção é efectuada com dois pares de sondas de oligonucleótidos: um par liga-se a uma cadeia da sequência a ser detectada; o outro par liga-se à outra cadeia da sequência a ser detectada. Cada par em conjunto engloba completamente a cadeia a que corresponde. A reacção é efectuada através de, primeiro, desnaturar (por exemplo, separar) as cadeias da sequência a ser detectada, seguido pela reacção das cadeias com os dois pares das sondas de

oligonucleótidos na presença de uma ligase termicamente estável tal que cada par de sondas de oligonucleótidos seja interligado separando então o produto de reacção, e seguidamente repetir ciclicamente o processo até que a sequência seja amplificada ao nível desejado. A detecção pode então ser efectuada da mesma forma como descrito em cima no que respeita à PCR.

Será de rápida compreensão que os passos de detecção aqui descritos possam ser efectuados directa ou indirectamente. Assim, por exemplo, quer se a ApoE2 ou a ApoE3 forem também detectadas no indivíduo, então é determinado que o indivíduo não seja homozigótico para a ApoE4; e se ambas a ApoE2 e a ApoE3 forem detectadas no indivíduo, então é determinado que o indivíduo não é nem homozigótico nem heterozigótico para a ApoE4. Outras formas de determinar indirectamente o tipo alélico podem ser através da medição dos marcadores polimórficos que estão ligados ao alelo da ApoE, como tem sido demonstrado para os VNTR (número variável de repetições em tandem) e para os alelos da ApoB. Ver Decorter et al., DNA & Cell Biology, Vol. 9, No. 6, pp. 461 - 469 (1990).

Como uma alternativa à focagem isoeléctrica e às técnicas para a detecção de alelos, o passo para a determinação da presença ou da ausência de uma isoforma da ApoE4 numa amostra pode ser efectuado através de um ensaio de anticorpos com um anticorpo que se liga selectivamente à ApoE4, isto é, um anticorpo que se liga a ApoE4 mas que não

exibe essencialmente nenhuma ligação a ApoE2 ou a ApoE3 nas mesmas condições de ligação. Quando se pretende determinar o complemento preciso da ApoE de um paciente e quer ou não esse paciente seja homozigótico ou heterozigótico para a ApoE4, então os anticorpos que se ligam selectivamente a ApoE2 e a ApoE3 podem também ser utilizados, isto é, um anticorpo que se liga a ApoE2 mas que não exhibe essencialmente nenhuma ligação a ApoE3 ou a ApoE4 nas mesmas condições de ligação; e um anticorpo que se liga a ApoE3 mas que não exhibe essencialmente nenhuma ligação a ApoE2 ou a ApoE4 nas mesmas condições de ligação.

Os anticorpos utilizados para se ligarem selectiva ou especificamente a ApoE2, a ApoE3, e a ApoE4 podem ser produzidos por qualquer técnica adequada. Por exemplo, os anticorpos monoclonais podem ser produzidos numa linha celular de hibridoma de acordo com as técnicas de Kohler e de Milstein, *Nature*, Vol. 265, pp. 495 - 497 (1975). A ApoE2, a ApoE3 ou a ApoE4 podem ser obtidas a partir de um paciente humano escolhido por ser homozigótico para estas. Sendo então purificadas pela técnica descrita em Rall et al., *Methods in Enzymol.*, Vol. 128, p. 273 (1986), e utilizadas como o imunogénio para a produção de anticorpos monoclonais ou policlonais. As isoformas da ApoE purificadas podem ser produzidas por meios recombinantes para expressar uma isoforma biologicamente activa, ou pode mesmo ser utilizado como um imunogénio um fragmento imunogénico daí resultante. Os fragmentos monoclonais Fab podem ser produzidos em *Escherichia coli* a partir de

sequências conhecidas através de técnicas recombinantes conhecidas na área. Ver, por exemplo, Huse, Science, Vol. 246, pp. 1275 - 1281 (1989) (técnicas de Fab recombinante); e Wenham et al., Lancet, Vol. 337, p. 1158 (1991) (iniciadores da PCR da ApoE). O DNA que codifica um subtipo da ApoE pode ser obtido e convertido noutra através da mutagénese sítio dirigida. Ver, por exemplo, Kunkel et al., Methods in Enzymol., Vol. 154, pp. 367 - 382 (1987); e Kunkel, Patente dos E. U. A. No. 4,873,192.

O termo "anticorpos" quando utilizado aqui refere-se a todos os tipos de imunoglobulinas, incluindo a IgG, a IgM, a IgA, a IgD e a IgE. Os anticorpos podem ser monoclonais ou policlonais e podem ser de qualquer espécie de origem, incluindo, por exemplo, de rato, de ratazana, de coelho, de cavalo, ou de humano, ou podem ser anticorpos quiméricos e incluírem fragmentos de anticorpo tal como por exemplo, os fragmentos Fab, os $F(ab')_2$ e os Fv, e os fragmentos correspondentes obtidos a partir de anticorpos diferentes de IgG.

Um anticorpo que se liga selectiva ou especificamente à ApoE ou a uma isoforma da ApoE particular (ligando) refere-se normalmente a uma molécula capaz de reagir com ou por outro lado de reconhecer ou de se ligar a esse ligando. Um anticorpo possui afinidade de ligação para um ligando ou é específico para um ligando se o anticorpo se ligar ou for capaz de ligar o ligando como medido ou determinado através de ensaios padrão de anticorpo -

antigénio ou de ligando - receptor, por exemplo, os ensaios competitivos, os ensaios de saturação, ou os imunoensaios padrão, tais como o ELISA ou o RIA. Esta definição de especificidade aplica-se a cadeias leves e/ou pesadas únicas, a CDRs, a proteínas de fusão ou a fragmentos de cadeias leves e/ou pesadas, que são específicas para o ligando se estas se ligarem ao ligando sozinho ou em combinação.

Os ensaios de anticorpos (imunoensaios) podem, em geral ser ensaios homogéneos ou ensaios heterogéneos. Num ensaio homogéneo a reacção imunológica envolve normalmente o anticorpo específico, um analito marcado, e a amostra de interesse. O sinal que provém a partir do marcador é modificado, directa ou indirectamente, após a ligação do anticorpo ao analito marcado. Tanto a reacção como a detecção imunológica da extensão daí resultante é realizada numa solução homogénea. Os marcadores imunoquímicos que podem ser utilizados incluem os radicais livres, os radioisótopos, os corantes fluorescentes, as enzimas, os bacteriófagos, as co-enzimas, e outros.

Numa abordagem de ensaio heterogéneo, os reagentes são normalmente os espécimes, o anticorpo e um sistema ou formas de produzir um sinal detectável. Podem ser utilizados espécimes similares como descrito em cima. O anticorpo é normalmente imobilizado num suporte, tal como em esferas, em placas ou em lamelas e colocado em contacto com o espécimen que é suposto conter o antigénio numa fase líquida. O suporte é seguidamente separado da fase líquida

e quer a fase de suporte quer a fase líquida são examinadas quanto a um sinal detectável utilizando meios de produzir tal sinal. O sinal está relacionado com a presença do analito no espécimen. As formas para produzir um sinal detectável incluem a utilização de marcadores radioactivos, marcadores fluorescentes, marcadores de enzimas e outros. Por exemplo, se o antigénio a ser detectado contiver um segundo sítio de ligação, um antigénio que se liga a esse sítio pode ser conjugado a um grupo de detecção e adicionado à solução de reacção de fase líquida antes do passo de separação. A presença do grupo de detecção no suporte sólido indica a presença do antigénio na amostra de teste. Exemplos de imunoensaios adequados são o radio-imunoensaio, os métodos de imunofluorescência, o imunoensaio de ligação à enzima e outros.

Os peritos na área estarão familiarizados com numerosos formatos de imunoensaios específicos e com variantes daí resultantes que podem ser úteis para efectuar o método aqui descrito. Ver, normalmente Maggio, *Enzyme-Immunoassay*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL (1980). Ver, também, a Patente dos E. U. A. No. 4,727,022 de Skold et al., "Methods for Modulating Ligand-Receptor Interactions and their Application"; a Patente dos E. U. A. No. 4,659,678 de Forrest et al.; a Patente dos E. U. A. No. 4,376,110 de David et al.; a Patente dos E. U. A. No. 4,275,149 de Litman et al.; a Patente dos E. U. A. No. 4,233,402 de Maggio et al.; e a Patente dos E. U. A. No. 4,230,767 de Boguslaski et al.

Os anticorpos que se ligam selectivamente a uma isoforma da ApoE, isto é, que se ligam a uma das ApoE2, ApoE3 ou ApoE4 ao mesmo tempo que não demonstram essencialmente nenhuma ligação entre eles sob as mesmas condição de ligação, podem ser conjugados a um suporte sólido apropriado para um ensaio de diagnóstico (por exemplo, esferas, placas, lamelas e poços formados a partir de materiais, tais como o látex ou o poliestireno) de acordo com técnicas conhecidas tais como a precipitação. Os anticorpos que se ligam a uma isoforma da ApoE podem da mesma forma ser conjugados a grupos detectáveis, tais como os radiomarcadores, por exemplo, o ^{35}S , o ^{125}I , e o ^{131}I ; os marcadores de enzimas, por exemplo, a peroxidase de rábano, a fosfatase alcalina; e os marcadores fluorescentes, por exemplo, a fluoresceína; de acordo com técnicas conhecidas.

Os estojos ("kits") para determinar a presença ou a ausência da ApoE4, e consequentemente a resposta esperada ao tratamento com fármacos AChEI deverão incluir pelo menos um reagente específico para detectar a presença ou a ausência da ApoE4 e as instruções para opções de tratamento recomendado com base no status da ApoE4. O estojo ("kit") pode incluir opcionalmente um ácido nucleico para a detecção do gene da ApoE4. Preferencialmente o estojo ("kit") pode compreender pelo menos dois ácidos nucleicos diferentes para a detecção do gene da ApoE4. O estojo ("kit") pode conter pelo menos um gene específico para o oligonucleótido da genotipagem para detectar a presença ou

a ausência do alelo da ApoE4. Preferencialmente o estojo ("kit") contém dois genes específicos para o oligonucleótido da genotipagem. Noutra versão o estojo ("kit") pode conter pelo menos um gene específico para a composição de iniciadores da genotipagem. A composição do iniciador contém preferencialmente pelo menos um gene específico para o oligonucleótido da genotipagem. Mais preferencialmente, a composição compreende pelo menos dois conjuntos de alelos específicos para os pares de iniciadores. Os dois alelos específicos para os oligonucleótidos da genotipagem podem ser colocados em recipientes separados.

O estojo ("kit") pode incluir opcionalmente instruções para os métodos de focagem isoeléctrica de forma a detectar a ApoE4.

Os estojos ("kits") de diagnóstico similares para levar a cabo ensaios de anticorpos podem ser produzidos de inúmeras formas. Numa versão, o estojo ("kit") de diagnóstico compreende: (a) um anticorpo que se liga a ApoE2, a ApoE3 ou a ApoE4 conjugado a um suporte sólido; e (b) um segundo anticorpo que se liga a ApoE2, a ApoE3 ou a ApoE4 conjugado a um grupo de detecção. Os reagentes podem também incluir agentes de auxílio tais como os agentes de tamponagem e os agentes de estabilização de proteínas, por exemplo, polissacarídeos e outros. O estojo ("kit") de diagnóstico pode conter adicionalmente, quando necessário, outros membros do sistema de produção de sinal de cujo o sistema o grupo de detecção é membro (por exemplo,

substratos de enzima), agentes para reduzir a interferência residual num teste, reagentes de controlo, aparelhos para conduzir um teste e outros. Outro estojo ("kit") de teste compreende: (a) um anticorpo como o anterior; e (b) um parceiro de ligação específico para o anticorpo conjugado a um grupo de detecção. Os agentes de auxilio como descrito acima podem também estar incluídos. O estojo ("kit") de teste pode ser armazenado de qualquer forma adequada, normalmente com todos os elementos num único recipiente juntamente com um manual de instruções impressas para efectuar o teste.

Um estojo ("kit") para utilizar na determinação da estratégia de tratamento de um paciente com demência pode compreender (a) um anticorpo capaz de reconhecer e de se ligar a um produto de expressão do polipeptídeo do gene da ApoE4; (b) um recipiente adequado para conter o anticorpo e uma amostra de fluido corporal do indivíduo em que o anticorpo pode contactar com o polipeptídeo da ApoE4, se este estiver presente; (c) forma de detectar a combinação do dito anticorpo com o polipeptídeo da ApoE4; e (d) instruções para a utilização do estojo ("kit").

Outro estojo ("kit") para utilizar na determinação da estratégia de tratamento de um paciente com demência compreende (a) um polinucleótido capaz de reconhecer e de se ligar a um produto de expressão do mRNA do gene da ApoE4; (b) um recipiente adequado para conter o polinucleótido e uma amostra de fluido corporal do paciente

em que o dito polinucleótido pode contactar com o mRNA da ApoE4, se este estiver presente; (c) forma de detectar a combinação do dito polinucleótido com o mRNA da ApoE4; e (d) instruções para a utilização do estojo ("kit").

Um estojo ("kit") adicional para utilizar na determinação da estratégia de tratamento de um paciente com demência compreende (a) um polinucleótido capaz de reconhecer e de se ligar à mesma porção da sequência de DNA do gene da ApoE4; (b) um recipiente adequado para conter o polinucleótido e uma amostra de fluido corporal do indivíduo em que o polinucleótido pode contactar com a sequência de DNA da ApoE4, se esta estiver presente; (c) forma de detectar a combinação do dito polinucleótido com a sequência de DNA da ApoE4; e (d) instruções para a utilização do estojo ("kit").

Métodos imunoquímicos para detectar a ApoE4

O ensaio imunoquímico compreende opcionalmente (mas preferencialmente) a combinação da amostra, tal como uma amostra de sangue recolhida do indivíduo com um agente redutor, seguida da colocação da amostra em contacto com um suporte sólido que liga especificamente a grupos sulfidrilo reactivos, a separação em seguida da amostra a partir do suporte sólido; e seguidamente a detecção através do imunoensaio quer: (i) da presença ou da ausência da ApoE na dita amostra, da presença da ApoE4 na dita amostra indicando que o indivíduo possui pelo menos um alelo para a

ApoE4, da ausência da ApoE4 na dita amostra indicando que o dito indivíduo não possui alelos para a ApoE4; quer (ii) da presença ou da ausência da ApoE immobilizada no suporte sólido, da presença da ApoE2 ou da ApoE3 immobilizadas no dito suporte sólido indicando que o dito indivíduo possui um ou nenhum alelo para a ApoE4, da ausência da ApoE2 e da ApoE3 immobilizadas no suporte sólido indicando que o dito indivíduo possui dois alelos para a ApoE4.

Pode ser utilizada qualquer amostra de material biológico contendo a ApoE, incluindo mas não limitado a uma amostra de fluido corporal. Por exemplo, a amostra pode ser escolhida a partir de sangue, de soro sanguíneo, de plasma sanguíneo, do fluido espinal cerebral ou de qualquer outro fluido ou tecido que contenha a ApoE do indivíduo.

Será de rápida compreensão que os passos de detecção aqui descritos possam ser efectuados directa ou indirectamente. Assim, por exemplo, quer se a ApoE2 ou a ApoE3 forem também detectadas no indivíduo, então é determinado que o indivíduo não é homozigótico para a ApoE4; e se ambas a ApoE2 e a ApoE3 forem detectadas no indivíduo, então é determinado que o indivíduo não é nem homozigótico nem heterozigótico para a ApoE4. Se quer a ApoE2 ou a ApoE3 estiverem presentes existe a possibilidade de o indivíduo ser heterozigótico para a ApoE4. A heterozigocidade para a ApoE4 é também indicada se a quantidade da ApoE ligada à coluna for determinada em cerca de duas vezes a quantidade eluída a partir da coluna.

Alternativamente, para efectuar distinções adicionais, o ensaio pode ser utilizado como um rastreio inicial e combinado com outro ensaio capaz de distinguir a ApoE2, a ApoE3 e a ApoE4 entre si, tal como um imunoensaio, uma focagem isoeléctrica ou uma análise pela PCR de DNA que codifica a ApoE2, a ApoE3 e a ApoE4.

Pode ser utilizado qualquer suporte sólido que ligue especificamente os grupos sulfidrilo reactivos. Por especificidade, entende-se que o suporte sólido ligará covalentemente os grupos sulfidrilo na presença de grupos de competição, tais como o amino, o hidroxilo, e o carboxilato. Estes suportes sólidos incluem, mas não estão limitados aos, suportes sólidos que empregam a química de tresil (ver Nilsson, *Methods Enzymol.*, Vol. 63, p. 56 (1984)); os géis activados contendo o dissulfeto de piridil (ver Egoroy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 72, p. 171 (1975)); ou as partes do ácido ditio-5-nitrobenzóico que produzem as ligações dissulfeto, e os géis de agarose TNB-tiol (ácido 5-tio-2-nitrobenzóico) (por exemplo, o produto da Pierce número 20409G, disponível pela Pierce Chemical Co., PO Box 117, Rockford, IL 61105). Os suportes sólidos preferidos são aqueles representados pela fórmula $R-COCH_2X$, em que R é um substrato sólido tal como um gel e X é um halogéneo, por exemplo, o Cl, o Br, o I, preferencialmente o I. O gel de acoplação SULFOLINK.RTM.™ é particularmente preferido e encontra-se disponível como os produtos números 44895G, 20405G, 20401 G, 20402G e 20403G da Pierce, PO Box 117, Rockford, IL 61105.

Qualquer agente capaz de reduzir a ligação dissulfeto nos resíduos de cisteína para os grupos sulfidrilos reactivos correspondentes pode ser utilizado como um agente redutor. Preferencialmente o agente redutor é um tiol de baixo peso molecular, mais preferencialmente o mercaptoetanol, o ditiotreitól e a mercaptoetilamina. A redução das ligações dissulfeto nas cisteínas será normalmente efectuada em condições estritamente alcalinas e desnaturantes, por exemplo, em ureia a 8 M ou em guanidina HCl a 6 M.

Assim que as amostras tiverem sido postas em contacto com o suporte sólido, serão separadas do suporte sólido através de qualquer forma conhecida e, se desejado, recolhidas para testes posteriores.

O passo do imunoensaio é efectuada através da ligação específica da ApoE com um anticorpo que se liga especificamente a ApoE. Os anticorpos incluem todos os tipos de imunoglobulinas, incluindo a IgG, a IgM, a IgA, a IgD e a IgE produzidas por qualquer método adequado como descrito acima.

Uma vantagem das técnicas precedentes é a de que não é necessário utilizar um anticorpo que se ligue especificamente a uma isoforma da ApoE sem se ligar a uma ou mais das outras isoformas. No entanto, tais anticorpos específicos das isoformas podem ser utilizados se desejado.

Os anticorpos específicos para a ApoE são facilmente produzidos e são conhecidos.

Os imunoensaios podem, em geral, ser ensaios homogéneos ou ensaios heterogéneos, como descrito acima. Como também descrito em cima, os anticorpos que se ligam especificamente a ApoE podem ser conjugados a um suporte sólido adequado para um ensaio de diagnóstico (por exemplo, esferas, placas, lamelas ou poços formados a partir de materiais, tais como o látex ou o poliestireno) de acordo com técnicas conhecidas, e podem também ser conjugados com grupos de detecção.

Os estojos ("kits") de diagnóstico para efectuar o ensaio imunoquímico podem ser produzido de inúmeras formas. O estojo ("kit") pode compreender: (a) um suporte sólido que liga especificamente grupos sulfidrilo reactivos; (b) um anticorpo que se liga a ApoE2, a ApoE3 e/ou a ApoE4; e (c) opcionalmente, a um agente de redução. Outro estojo ("kit") de diagnóstico pode conter: (a) um anticorpo que se liga a ApoE2, a ApoE3 e/ou a ApoE4 conjugado com um suporte sólido; e (b) um segundo anticorpo que se liga a ApoE2, a ApoE3 e/ou a ApoE4 conjugado com um grupo de detecção.

Os reagentes podem também incluir agentes de auxílio tais como os agentes de tamponagem e os agentes de estabilização de proteínas, por exemplo, os polissacarídeos e outros. O estojo ("kit") de diagnóstico pode conter

adicionalmente, quando necessário, outros membros do sistema de produção de sinal de cujo o sistema o grupo de detecção é membro (por exemplo, substratos de enzima), agentes para reduzir a interferência residual num teste, reagentes de controlo, aparelhos para conduzir um teste e outros. Alternativamente um estojo ("kit") de teste pode compreender: (a) um anticorpo como o anterior; e (b) um parceiro de ligação específico para o anticorpo conjugado a um grupo de detecção. Os agentes de auxilio como descrito acima podem também estar incluídos. O estojo ("kit") de teste pode ser armazenado de qualquer forma adequada, normalmente com todos os elementos num único recipiente juntamente com um manual de instruções impressas para efectuar o teste e interpretar os resultados.

Em resumo, o sangue é recolhido e deixado a coagular, e é removido o soro. Uma alíquota de soro é colocada num agente de redução (por exemplo, o ditiotreitol ou o β -mercaptoetanol) para reduzir as cisteínas, produzindo assim grupos sulfidrilo reactivos. O soro reduzido é seguidamente incubado com um suporte activado que reage específica e quantitativamente com os grupos sulfidrilo (um exemplo deste suporte é o gel de acoplação SULFOLINK.RTM.[™] produzido pela Pierce Inc.). A incubação do soro reduzido com este suporte activado irá assim ligar todas as moléculas da ApoE que contenham cisteína. Após a incubação, o soro contendo as proteínas não ligadas é separado do suporte activado com as suas proteínas de ligação (quer por sedimentação quer por centrifugação). O

soro é seguidamente testado quanto à presença ou à ausência da ApoE através de um anticorpo específico para a ApoE utilizando um formato de ELISA, com um dos diversos esquemas de detecção possíveis, por exemplo, o colorimétrico. A ApoE2 ou a ApoE3 irão ligar-se quantitativamente ao suporte activado, e não será detectada nenhuma ApoE livre no soro em ELISA. A ApoE4 não se irá ligar ao suporte activado, e será por isso detectado no ensaio de ELISA. O soro de um paciente homozigótico para a ApoE4 (contendo apenas a isoforma da ApoE4) apresentará aproximadamente a mesma quantidade da ApoE no soro após a incubação com o suporte activado do que antes da incubação. O soro de um paciente heterozigótico para a ApoE4 (contendo apenas tanto a isoforma da ApoE4 como as outras isoformas da ApoE) apresentará aproximadamente metade da ApoE detectada após a incubação com o suporte activado do que antes da incubação.

Os exemplos de análises de genótipo específicas são apresentados seguidamente.

EXEMPLO 2

A análise do genótipo para um paciente pode ser efectuada utilizando DNA de elevado peso molecular, ou alternativamente RNA, isolado a partir de 5 mL de todo o sangue extraído a partir de cada paciente. O genótipo da ApoE foi determinado utilizando um método de elongação do iniciador de alelo específico. Os iniciadores marcados D, E, F, G e H foram sintetizados pela Genosys Biotech (The

Woodland, Tex.) utilizando sequências de iniciadores fornecidas por Main et al., J. Lipid Res., Vol. 32, pp. 183 - 187 (1991). As reacções foram efectuadas num volume de 50 µL contendo 1 µg de DNA; desoxiadenosina trifosfato, desoxicitidina trifosfato, desoxitimidina trifosfato e desoxiguanosina trifosfato, cada uma delas a 0,2 mmol/L; dimetilsulfóxido a 10%; 12,5 pmol de cada iniciador D, E, F, ou G; 25 pmol do iniciador H; e 10 µL de tampão de reacção de PCR a 10 X (Vector Biosystem, Toronto, ONT.). O DNA na mistura de reacção foi primeiramente desnaturado durante 10 minutos a 96 °C e seguidamente arrefecido a 4 °C. Uma unidade da Taq Polimerase (Vector Biosystem, Toronto, ONT.) foi depois adicionada a cada amostra. Cada amostra foi reaquecida durante 2 minutos a 96 °C e sujeita a trinta ciclos num termociclador com cada ciclo a consistir em 10 segundos de desnaturação a 96 °C, 30 segundos de hibridização a 58 °C e 1 minuto de elongação a 65 °C. Os produtos de reacção foram observados através de electroforese com 10 µL da mistura de reacção num gel de agarose a 1% contendo tampão TPE (Tris-fosfato a 0,08 mol/L, EDTA a 0,002 mol/L, Sigma St-Louis, MO) e brometo de etídio (0,15 µg/mL) durante 1 hora a 67 V. Os géis foram seguidamente fotografados e o perfil das bandas foi comparado com padrões conhecidos.

EXEMPLO 3

Alternativamente, o fenótipo da ApoE pode ser determinado num paciente utilizando uma amostra de soro ou

de fluido espinal cerebral. As proteínas são separadas por tamanhos num gel de poliacrilamida SDS de 25 cm (10%) e transferidas para um filtro de nitrocelulose utilizando uma célula Trans-blot da BIORAD® e a detecção da proteína da ApoE é efectuada utilizando um anticorpo policlonal incitado contra a proteína da ApoE humana (International Immunology Corp., CA, Dil. 1:2000). Para controlar a especificidade do anticorpo, a adsorção do anticorpo anti-ApoE à proteína da ApoE humana purifica (MW 34 - 36 kDa) é efectuada observando-se se este bloqueará especificamente a detecção da ApoE. Os marcadores de pesos moleculares (Rainbowmarkers, Amersham) correram em poços adjacentes ao mesmo tempo que a visualização das bandas é efectuada com um estojo ("kit") de detecção quimiluminescente (Amersham, Cat. No. RPN 2100). A quantificação dos sinais autoradiográficos é efectuada utilizando um sistema de análise de imagens MCID (Ste-Catherine, ONT.) equipado com o software de análise 1 D-gel (ver, Patente dos E. U. A. No. de Aplicação US20020086290A1 publicada; Patente dos E. U. A. No. 6,391,553).

Outros Métodos de Genotipagem da ApoE Utilizando Técnicas de Identificação de SNP Comuns

A genotipagem da ApoE pode também ser conseguida através de métodos comuns para identificas SNPs. Podem ser utilizadas várias técnicas diferentes para identificas e caracterizar os SNPs, incluindo a análise do polimorfismo de conformação de cadeia simples (SSCP), a análise da

heteroduplex através de cromatografia líquida desnaturante de alta resolução (DHPLC), a sequenciação de DNA directa e os métodos computacionais. Ver Shi, Clin. Chem., Vol. 47, pp. 164 - 172 (2001). Graças à abundância da informação de sequências em bases de dados públicas, as ferramentas computacionais podem ser utilizadas para identificar SNPs *in silico* através do alinhamento de sequências submetidas independentemente para um dado gene (quer para o cDNA quer para sequências genómicas). A comparação dos SNPs obtidos experimentalmente e através de métodos *in silico* demonstrou que 55% dos SNPs candidatos encontrados pelo SNPfinder (http://ipgws.nci.nih.gov:82/perl/snp/snp_cgi.pl) foram também descobertos experimentalmente. Ver Cox et al., Hum. Mutal., Vol. 17, pp. 141 - 150 (2001). No entanto, estes métodos *in silico* encontraram apenas 27% de SNPs válidos.

Os métodos de tipagem de SNPs mais comuns incluem normalmente, a hibridização, a elongação do iniciador e os métodos de clivagem. Cada um destes métodos deve estar conectado a um sistema de detecção apropriado. As tecnologias de detecção incluem a polarização fluorescente (ver Chan et al., Genome Res., Vol. 9, pp. 492 - 499 (1999)); a detecção luminométrica da libertação de pirofosfato (pirosequenciação) (ver Ahmadian et al., Anal. Biochem., Vol. 280, pp. 103 - 110 (2000)); os ensaios de clivagem baseados na transferência de energia fluorescente de ressonância (FRET), a DHPLC e a espectrometria de massa (ver Shi, *supra*; e a Patente dos E. U. A. No. 6,300,076 B1). Os outros métodos para detectar e caracterizar SNPs

são aqueles descritos nas Patentes dos E. U. A. Nos. 6,297,018 B1 e 6,300,063 B1.

Numa versão, a detecção de um polimorfismo pode ser conseguida através de meios da chamada tecnologia INVADER™ (disponível pela Third Wave Technologies Inc. Madison, WI). Neste ensaio, um oligonucleótido "invasor" a montante e uma sonda parcialmente sobreposta a jusante em conjunto formam uma estrutura específica quando ligados a um molde de DNA complementar. Esta estrutura é reconhecida e cortada num sítio específico pela enzima Cleavase, e que resulta na libertação da extremidade 5' da sonda de oligonucleótidos. Este fragmento serve então como um oligonucleótido "invasor" no que diz respeito aos alvos sintéticos secundários e às sondas de sinal secundárias fluorescentemente marcadas contidas na mistura de reacção. Isto resulta numa clivagem específica das sondas de sinal secundárias pela enzima Cleavase. O sinal fluorescente é produzido quando esta sonda secundária, marcada com moléculas de corantes capazes de fluorescer na transferência de energia de ressonância, for clivada. As Cleavases apresentam requerimentos estridentes relativos à estrutura formada pela sobreposição das sequências ou das extremidades do DNA e podem, desta forma, ser utilizadas para detectar especificamente erros de emparelhamento de pares de bases únicos imediatamente a montante do sítio de clivagem na cadeia de DNA a jusante. Ver Ryan et al., Molecular Diagnosis, Vol. 4, No 2, pp. 135 - 144 (1999) e Lyamichev et al., Nature Biotechnol., Vol. 17, pp. 292 -

296 (1999). Ver também Patente dos E. U. A. Nos. 5,846,717 e 6,001,567.

Uma composição pode conter dois ou mais oligonucleótidos diferentemente marcados para a genotipagem para simultaneamente pesquisar a identidade dos nucleótidos em dois mais sítios polimórficos. Está também contemplado que as composições dos iniciadores podem conter dois ou mais conjuntos de pares de iniciadores de alelo específico para permitir simultaneamente a descoberta e a amplificação de duas ou mais regiões contendo um sítio polimórfico.

Os oligonucleótidos da genotipagem da ApoE da invenção podem também ser imobilizados numa ou sintetizados numa superfície sólida tal como um micro-chip, uma esfera ou uma lamela de vidro (ver, por exemplo, WO 98/20020 e WO 98/20019). Tais oligonucleótidos de genotipagem imobilizados podem ser utilizados numa variedade de ensaios de detecção de polimorfismos incluindo, mas não limitados a, ensaios de hibridização da sonda e de elongação pela polimerase. Os oligonucleótidos de genotipagem da ApoE imobilizados podem compreender uma disposição ("array") ordenada de oligonucleótidos desenhados para o rastreio imediato de uma amostra de DNA quanto aos polimorfismos em múltiplos genes ao mesmo tempo.

Um iniciador de oligonucleótidos de alelo específico possui um nucleótido terminal 3', ou preferencialmente um penúltimo nucleótido 3', que é complementar a

apenas um nucleótido de um SNP particular, agindo assim como um iniciador para a elongação mediada pela polimerase apenas se o alelo que contém esse nucleótido estiver presente. Os iniciadores de oligonucleótidos de alelo específico que hibridizam quer com a cadeia codificante quer com a não codificante estão contemplados. Um iniciador ASO para a detecção dos polimorfismos do gene da ApoE pode ser desenvolvido utilizando técnicas conhecidas pelos peritos na área.

Outros oligonucleótidos de genotipagem hibridizam com uma região alvo localizada num de vários nucleótidos a montante ou num dos novos sítios polimórficos aqui identificados. Tais oligonucleótidos são úteis nos métodos de elongação do iniciador mediados pela polimerase para detectar um dos novos polimorfismos aqui descritos e por conseguinte estes oligonucleótidos de genotipagem são referidos aqui como "oligonucleótidos de elongação de iniciador". Preferencialmente, a extremidade 3' de um oligonucleótidos de elongação de iniciador é um desoxinucleótido complementar ao nucleótido localizado imediatamente adjacente ao sítio polimórfico.

Um estojo ("kit") pode compreender pelo menos dois oligonucleótidos de genotipagem armazenados em recipientes separados. O estojo ("kit") pode também conter outros componentes, tais como o tampão de hibridização (onde os oligonucleótidos são utilizados como uma sonda) armazenado num recipiente separado. Alternativamente, onde

os oligonucleótidos são utilizados para amplificar uma região alvo, o estojo ("kit") pode conter, armazenados em recipientes separados, uma polimerase e um tampão de reacção optimizado para a elongação do iniciador mediada pela polimerase, tal como numa PCR.

As composições e os estojos ("kits") dos oligonucleótidos acima descritos são úteis em métodos para a genotipagem e/ou para a haplotipagem do gene da ApoE num indivíduo. Quando utilizado aqui, os termos "genótipo da ApoE" e "haplotipo da ApoE" referem-se ao genótipo ou ao haplotipo que apresenta(m) o par ou pares de nucleótidos ou o(s) nucleótido(s), respectivamente, que está presente num ou em mais dos sítios polimórficos aqui descritos e pode também incluir opcionalmente o par de nucleótidos ou o nucleótido presente num ou em mais sítios polimórficos adicionais no gene da ApoE. Os sítios polimórficos adicionais podem ser sítios polimórficos normalmente conhecidos ou sítios que são subsequentemente descobertos.

Uma versão do método de genotipagem envolve o isolamento a partir do indivíduo de uma mistura de ácido nucleico compreendendo as duas cópias do gene da ApoE, ou um fragmento daí resultante, que está presente no indivíduo, e a determinação da identidade do par de nucleótidos num ou em mais dos sítios polimórficos nas duas cópias para atribuir um genótipo da ApoE ao indivíduo. Como será prontamente entendido pelo perito na área, as duas "cópias" de um gene num indivíduo podem ser o mesmo alelo ou podem

ser alelos diferentes. Numa versão particularmente preferida, o método de genotipagem compreende a determinação do par de nucleótidos em cada sítio polimórfico.

Normalmente, a mistura de ácido nucleico ou de proteína é isolada a partir de uma amostra biológica incluindo uma amostra de fluido corporal, retirada do indivíduo, tal como uma amostra de sangue ou uma amostra de tecido. Amostras de tecido adequadas incluem, mas não estão limitadas a; todo sangue, sémen, CSF, saliva, lágrimas, urina, material fecal, suor, células da mucosa oral, pele, e biopsias de tecidos de órgãos específicos, tais como os músculos ou o tecido dos nervos e o cabelo. A mistura de ácido nucleico pode compreender DNA, mRNA ou cDNA genómicos e, nos últimos dois casos, a amostra biológica deve ser obtida a partir de um órgão no qual o gene da ApoE é expresso. Além disso será compreendido pelos peritos que as preparações de mRNA e de cDNA não devem ser utilizadas para detectar polimorfismos localizados nos intrões ou nas regiões não transcritas a 5' e a 3'. Se um fragmento de um gene da ApoE for isolado, deve conter o(s) sítio(s) polimórfico(s) a ser(em) genotipado(s).

Uma versão do método de haplotipagem compreende o isolamento a partir do indivíduo uma molécula de ácido nucleico contendo apenas uma das duas cópias do gene da ApoE, ou de um fragmento daí resultante, que se encontra presente no indivíduo e que determina nessa cópia a identidade do nucleótido num ou mais dos sítios polimórficos nessa cópia para atribuir um haplotipo da ApoE ao

indivíduo. O ácido nucleico pode ser isolado utilizando qualquer método capaz de separar as duas cópias do gene ou do fragmento da ApoE, incluindo mas não limitado a um dos métodos descritos acima para preparar isogênes da ApoE, com a clonagem alvo *in vivo* a ser a abordagem preferida.

Como será expeditamente apreciado pelos peritos na área, qualquer clone do indivíduo fornecerá apenas informação de haplotipo numa das duas cópias do gene da ApoE presentes num indivíduo. Se a informação do haplotipo for desejada para a outra cópia do indivíduo, será necessário examinar clones da ApoE adicionais. Normalmente, devem ser examinados pelo menos cinco clones para existir mais do que 90% de probabilidade de determinar o haplotipo de ambas as cópias do gene da ApoE no indivíduo. Numa versão particularmente preferível, é identificado o nucleótido de cada sítio polimórfico.

Numa versão preferencial, um par de haplotipos da ApoE é determinado para um indivíduo através da identificação da sequência de nucleótidos faseada num ou em mais dos sítios polimórficos em cada cópia do gene da ApoE que está presente no indivíduo. Numa versão particularmente preferível, o método de haplotipagem compreende a identificação da sequência de nucleótidos faseada em cada sítio polimórfico de cada cópia de cada gene da ApoE. Quando se procede à haplotipagem de ambas as cópias do gene, o passo da identificação é preferencialmente efectuado em cada cópia do gene a ser colocada em recipientes separados. No entanto, é também observado que se as duas cópias forem

marcadas com rastros diferentes, ou se por outro lado forem distinguíveis ou identificáveis separadamente, é possível em alguns casos realizar o método no mesmo recipiente. Por exemplo, se a primeira e a segunda cópia do gene forem marcadas com o primeiro e o segundo corante fluorescente diferente, respectivamente, e um oligonucleótido de alelo específico for marcado com um terceiro corante fluorescente diferente podem ser utilizadas para analisar o(s) sítio(s) polimórfico(s), então a detecção de uma combinação do primeiro e do terceiro corantes deve identificar o polimorfismo na primeira cópia do gene enquanto que a detecção de uma combinação do segundo e do terceiro corantes deve identificar o polimorfismo na segunda cópia do gene.

Em ambos os métodos de genotipagem e de haplotipagem, a identidade de um(uns) nucleótido(s) (ou par ou pares de nucleótidos) num(ns) sítio(s) polimórfico(s) pode ser determinada através da amplificação de uma(s) região(ões) alvo contendo o(s) sítio(s) polimórficos directamente a partir de uma ou de ambas as cópias do gene da ApoE, ou de um fragmento daí resultante, e a sequência da(s) região(ões) amplificada(s) é determinada por métodos convencionais. Será de rápida compreensão pelo perito que apenas um nucleótido será detectado em cada sítio polimórfico em indivíduos que são homozigóticos para esse sítio, enquanto que serão detectados dois nucleótidos diferentes se o indivíduo for heterozigótico para esse sítio. O polimorfismo pode ser identificado directamente, referido como uma identificação do tipo positivo, ou por inferência, referido como uma identificação do tipo

negativo. Por exemplo, quando uma SNP é conhecida por ser a guanina ou a citosina numa população de referência, pode ser positivamente determinado um sítio por ser quer a guanina quer a citosina para todos os indivíduos homozigóticos para esse sítio, ou tanto a guanina como a citosina, se o indivíduo foi heterozigótico para esse sítio. Alternativamente, o sítio pode ser negativamente determinado por não ser a guanina (e assim citosina/citosina) ou por não ser a citosina (e assim guanina/guanina).

Adicionalmente, a identidade do(s) alelo(s) presente(s) em qualquer dos novos sítios polimórficos aqui descritos pode ser indirectamente determinada através da genotipagem de um sítio polimórfico não descrito aqui que está em ligação de desequilíbrio com o sítio polimórfico que é de interesse. Diz-se que dois sítios estão em ligação de desequilíbrio se a presença de uma variante particular num sítio aumenta a predictabilidade de outra variante no segundo sítio. Ver Stevens, Mol. Diag., Vol. 4, pp. 309 - 317 (1999). Os sítios polimórficos em ligação de desequilíbrio com os sítios polimórficos presentemente descritos podem ser localizados em regiões do gene ou em outras regiões genómicas não examinadas aqui. A genotipagem de um sítio polimórfico em ligação de desequilíbrio com os novos sítios polimórficos aqui descritos pode ser efectuada por, mas não limitada a, qualquer um dos métodos acima mencionados para detectar a identidade do alelo num sítio polimórfico.

A(s) região(ões) alvo pode(m) ser amplificada(s) utilizando qualquer método de amplificação direccionado por oligonucleótidos incluindo, mas não limitado à, PCR (ver Patente dos E. U. A. No. 4,965,188); à LCR (ver Barany et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 88, pp. 189 - 193 (1991); e WO 90/01069); e ao ensaio de ligação ao oligonucleótido (ver Landegren et al., Science, Vol. 241, pp. 1077 - 1080 (1988)). Os oligonucleótidos úteis como iniciadores e sondas nestes métodos devem hibridizar especificamente com uma região do ácido nucleico que contém ou é adjacente ao sítio polimórfico. Normalmente, os oligonucleótidos apresentam entre os 10 e os 35 nucleótidos de comprimento e preferencialmente, entre os 15 e os 30 nucleótidos de comprimento. Mais preferencialmente, os oligonucleótidos apresentam 20 - 25 nucleótidos de comprimento. O comprimento exacto dos oligonucleótidos irá depender de muitos factores que são frequentemente considerados e praticados pelos peritos.

Outros procedimentos de amplificação de ácidos nucleicos conhecidos podem ser utilizados para amplificar a região alvo incluindo os sistemas de amplificação com base na transcrição (ver Patente dos E. U. A. Nos. 5,130,238 e 5,169,766; EP 329,822; e WO 89/06700); e os métodos isotérmicos (ver Walker et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 89, pp. 392 - 396 (1992)).

Um(ns) polimorfismo(s) na região alvo pode(m) também ser avaliado(s) antes ou após a amplificação utilizando um dos diversos métodos com base na hibridização

conhecidos na área. Normalmente, os oligonucleótidos de alelo específico são utilizados para efectuar tais métodos. Os oligonucleótidos de alelo específico podem ser utilizados como pares de sondas diferentemente marcados, com um membro do par a apresentar um emparelhamento perfeito com uma variante de uma sequência alvo e o outro membro a apresentar um emparelhamento perfeito com uma variante diferente. Em algumas versões, pode ser detectado ao mesmo tempo mais do que um sítio polimórfico utilizando um conjunto de oligonucleótidos de alelo específico ou pares de oligonucleótidos. Preferencialmente, os membros do conjunto possuem temperaturas fusão entre os 5 °C e mais preferencialmente entre os 2 °C, entre cada um quando se hibridizam a cada um dos sítios polimórficos a serem detectados.

A hibridização de um oligonucleótido de alelo específico para um polinucleótido alvo pode ser efectuada com ambas as entidades em solução ou essa hibridização pode ser efectuada quer quando o oligonucleótido quer quando o polinucleótido alvo estejam covalente ou não covalentemente fixados a um suporte sólido. A ligação pode ser mediada, por exemplo, através de interacções anticorpo - antigénio, por poli-L-Lis, por estreptavidina ou por avidina-biotina, através de pontes salinas, por interacções hidrofóbicas, por ligações químicas, por ligação cruzada de UV, etc. Os oligonucleótidos de alelo específico podem ser sintetizados directamente no suporte sólido ou ligados ao suporte sólido subsequentemente à síntese. Os suportes sólidos adequados

para a utilização em métodos de detecção incluem substratos feitos de Silicone, vidro, plástico, papel, e outros, que podem ser formados, por exemplo, em poços (tal como em placas de 96 poços), em lamelas, em lâminas, em membranas, em fibras, em chips, em discos e em esferas. O suporte sólido pode ser tratado, revestido ou derivatizado para facilitar a imobilização do oligonucleótido de alelo específico ou do ácido nucleico alvo.

O genótipo ou o haplotipo para o gene da ApoE de um indivíduo pode também ser determinado através da hibridização de uma amostra de ácido nucleico contendo uma ou ambas as cópias do gene com as disposições ("arrays") ou com as sub-disposições ("arrays") de ácido nucleico, tal como descrito em WO 95/11995. As disposições ("arrays") devem conter um conjunto de oligonucleótidos de alelo específico representando cada um dos sítios polimórficos a serem incluídos no genótipo ou no haplotipo.

A identidade dos polimorfismos pode também ser determinada utilizando uma técnica de detecção de erros de emparelhamento, incluindo, mas não limitado ao, método da protecção da RNase utilizando ribossondas (ver Winter et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 82, p. 7575 (1985); e Meyrs et al., Science, Vol. 230, p. 1242 (1985)) e as proteínas que reconhecem os erros de emparelhamento de nucleótidos tais como a proteína mutS de *E. coli* (ver Modrich, Ann. Rev. Genet., Vol. 25, pp. 229 - 253 (1991)). Alternativamente, as variantes alélicas podem ser

identificadas através da análise de SSCP (ver Orita et al., Genomics, Vol. 5, pp. 874 -879 (1989); e Humphries et al., "Molecular Diagnosis of Genetic Diseases", Elles, Ed., pp. 321 - 340 (1996)) ou através da electroforese em gel de gradiente desnaturante (ver Wartel et al., Nucl. Acids Res., Vol. 18, pp. 2699 - 2706 (1990); e Sheffield et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86, pp. 232 - 236 (1989)).

Um método de alongação de iniciador mediado pela polimerase pode também ser utilizado para identificar o(s) polimorfismo(s). Diversos desses métodos têm sido descritos em Patentes e na literatura científica e incluem o método "Genetic Bit Analysis" (WO 92/15712) e a análise da porção genética mediada pela ligase/polimerase. Ver Patente dos E. U. A. No. 5,679,524. Os métodos relacionados estão descritos na WO 91/02087, na WO 90/09455, na WO 95/17676, nas Patentes dos E. U. A. Nos. 5,302,509 e 5,945,283. Os iniciadores alongados contendo um polimorfismo podem ser detectados através de espectrometria de massa como descrito na Patente dos E. U. A. No. 5,605,798. Outro método de alongação dos iniciadores é a PCR de alelo específico. Ver Ruafio et al., Nucl. Acids Res., Vol. 17, p. 8392 (1989); Ruafio et al., Nucl. Acids Res., Vol. 19, pp. 6877 - 6882 (1991); WO 93/22456; e Turki et al., J. Clin. Invest., Vol. 95, pp. 1635 - 1641 (1995). Adicionalmente, podem ser investigados múltiplos sítios polimórficos através da amplificação simultânea de múltiplas regiões do ácido nucleico utilizando conjuntos de iniciadores de alelo específico como descrito em Wallace et al., WO 89/10414.

Numa versão preferencial, os dados da frequência do haplotipo para cada grupo etnogeográfico são examinados para determinar se são consistentes com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. O equilíbrio de Hardy-Weinberg (ver Hartl et al., "Principles of Population Genomics", Sinauer Associates, Sunderland, MA, 3rd Edition (1997)) postula que a frequência para encontrar o par de haplotipos H_1/H_2 é igual a $P_{H-W} (H_1/H_2) = 2p(H_1) p(H_2)$ se $H_1 \neq H_2$ e $P_{H-W} (H_1/H_2) = p(H_1) p(H_2)$ se $H_1 = H_2$. Uma diferença estatística significativa entre as frequências do haplotipo observadas e as esperadas pode dever-se a um ou a mais factores incluindo a consanguinidade significativa no grupo populacional, a uma forte pressão selectiva no gene, amostragem tendenciosa, e/ou erros no processo da genotipagem. Se foram observadas grandes derivações no equilíbrio de Hardy-Weinberg num grupo etnogeográfico, o número de indivíduos desse grupo pode ser aumentado para verificar se a derivação se deve a uma amostragem tendenciosa. Se uma amostra de grande número não reduzir a diferença entre as frequências de pares de haplotipos observadas e esperadas, então pode-se considerar a realização de uma haplotipagem ao indivíduo utilizando um método de haplotipagem directa, tal como, por exemplo, a tecnologia CLASPER SYSTEM™ (Patente dos E. U. A. No. 5,866,404), a SMD ou a PCR de longa distância de alelo específico. Ver Michalotos-Beloin et al., Nucl. Acids Res., Vol. 24, pp. 4841 - 4843 (1996).

Numa versão deste método para predizer um par de haplotipos da ApoE, o passo de atribuição envolve a

realização da seguinte análise. Primeiro, cada um dos pares de haplotipo possíveis é comparado com os pares de haplotipos da população de referência. Normalmente, apenas um dos pares de haplotipos na população de referência corresponde a um par de haplotipos possíveis e esse par é atribuído ao indivíduo. Ocasionalmente, apenas um haplotipo representado nos pares de haplotipos de referência é consistente com um par de haplotipos possível para um indivíduo, e nesses casos é atribuído ao indivíduo um par de haplotipos contendo este haplotipo conhecido e um novo haplotipo que deriva da subtração do haplotipo conhecido do par de haplotipos possíveis. Em casos raros, quer nenhum haplotipo na população de referência é consistente com os pares de haplotipos possíveis ou alternativamente, múltiplos pares de haplotipos de referência são consistentes com os pares de haplotipos possíveis. Nestes casos, o indivíduo é preferencialmente haplotipado utilizando um método de haplotipagem molecular directa, tal como, por exemplo, a tecnologia CLASPER SYSTEM™ (Patente dos E. U. A. No. 5,866,404), a SMD ou a PCR de longa distância de alelo específico. Ver Michalotos-Beloin et al., *supra*.

Glossário

"Anticorpos" quando utilizado aqui inclui anticorpos policlonais e monoclonais, anticorpos quiméricos, de cadeia simples e humanizados, bem como fragmentos Fab, incluindo os produtos de um Fab ou de outra biblioteca de expressão da imunoglobulina.

"Polinucleótido" refere-se normalmente a qualquer polirribonucleótido (RNA) ou a qualquer polidesoxirribonucleótido (DNA), que pode ser RNA ou DNA não modificado ou modificado. Os "polinucleótidos" incluem, sem limitação, o DNA de cadeia simples e de cadeia dupla, o DNA que seja uma mistura de regiões de cadeia simples e dupla, o RNA de cadeia simples e dupla, e RNA que seja uma mistura de regiões de cadeia simples e dupla, as moléculas híbridas que compreendem o DNA e o RNA que pode ser de cadeia simples ou, mais normalmente de cadeia dupla ou uma mistura de regiões de cadeia simples e dupla. Adicionalmente, "polinucleótido" refere-se a regiões de cadeia tripla compreendendo o RNA ou o DNA ou tanto o RNA como o DNA. O termo "polinucleótido" inclui também DNAs ou RNAs que contêm uma ou mais bases modificadas e DNAs ou RNAs com estruturas modificadas para a estabilidade ou por outras razões.

A presente invenção não se limita aos termos das versões particulares descritas nesta aplicação, que se entendem como simples ilustrações de aspectos individuais da invenção. Podem ser efectuadas muitas modificações e variações da invenção sem sair deste âmbito, como será evidente para os peritos na área.

Lisboa, 4 de Setembro de 2009

REIVINDICAÇÕES

"MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DA DEMÊNCIA COM BASE NO GENÓTIPO DA APO E"

1. Um método *in vitro* para determinar a capacidade de resposta de um indivíduo com demência ao tratamento com a Rivastigmina compreendendo:

- a) a determinação para cada uma das duas cópias do gene da ApoE presente no indivíduo, da natureza do genótipo da ApoE, em que
- b) se uma ou ambas as cópias do gene da ApoE presente no indivíduo contém o alelo $\epsilon 4$, então o paciente é colocado num grupo de resposta positiva; ou
- c) se nenhuma das duas cópias do gene da ApoE do paciente contém o alelo $\epsilon 4$ então o paciente é colocado num grupo de resposta negativa.

2. O método da reivindicação 1, em que a demência é seleccionada a partir do grupo constituído pela: DAT (demência de tipo Alzheimer) pela demência vascular, pela demência com corpos de Lewy, pela demência da doença de Parkinson, pela demência do Síndrome de Down e pela deterioração cognitiva moderada.

3. O método da reivindicação 2, em que a demência é a DAT.

4. O método da reivindicação 2, em que a rivastigmina é utilizada numa dose de 6 mg/dia ou superior.

Lisboa, 4 de Setembro de 2009

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- US 5588167 A
- US 4302204 A, Wahl
- US 4358535 A, Falkow
- US 4563419 A, Ranki
- US 4994373 A, Stavrianopoulos
- US 4683195 A
- US 4683202 A
- US 4800159 A
- US 4965188 A
- US 4873182 A, Kunkel
- US 4727022 A, Skold
- US 4659678 A, Forrest
- US 4376110 A, David
- US 4275149 A, Lilman
- US 4233402 A, Maggio
- US 4230767 A, Boguslaski
- US 20020086290 A1
- US 6391553 B
- US 6300076 B1
- US 6297018 B1
- US 6300063 B1
- US 5848717 A
- US 6001567 A
- WO 9820020 A
- WO 9820019 A
- WO 9801069 A
- US 5130238 A
- US 5169766 A
- EP 329822 A
- WO 8906700 A
- WO 9511995 A
- WO 9215712 A
- US 5679524 A
- WO 9102087 A
- WO 9009455 A
- WO 8517676 A
- US 5302509 A
- US 5945283 A
- US 5605798 A
- WO 9322456 A
- WO 8910414 A, Wallace
- US 5666404 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- Forsyth. *Phys. Ther.*, 1998, vol. 78, 1325-1331
- Evans et al. *JAMA*, 1989, vol. 262, 2551-2556
- Merritt. *Textbook of Neurology*. Lea & Febiger, 1979, 484-489
- Gilroy ; Meyer. *Medical Neurology*. MacMillan Publishing Co, 1979, 175-179
- Schumock. *J. Health Syst. Pharm.*, 1996, vol. 55 (52), 17-21
- Hay ; Ernst. *Am. J. Public Health*, 1987, vol. 77, 1169-1175
- Adams ; Victor. *Principles of Neurology*, 1977, 401-407
- Mayeux ; Sano. *NEJM*, 1999, vol. 341, 1670-1679
- Bayles. *Semin. Speech Lang.*, 2001, vol. 22 (4), 251-259
- Storey et al. *Front Biosci.*, 2002, vol. 7, E155-E164
- Tanzi et al. *Neuron*, 2001, vol. 32 (2), 181-184
- Myers et al. *Curr. Opin. Neurol.*, 2001, vol. 14 (4), 433-440
- Shastri. *Molecular and Cell Biological Aspects of Alzheimer Disease. J. Hum. Genet.*, 2001, vol. 46 (11), 609-618
- Baraitser. *The Genetics of Neurological Disorders*. 1990, 85-88
- Scarmeas et al. *Neurology*, 2002, vol. 58 (8), 1182-1188
- Rosenberg. *The Molecular and Genetic Basis of Alzheimer's Disease: The End of the Beginning: The 2000 Wartenberg Lecture. Neurology*, 2000, vol. 54 (11), 2045-2054
- Selkoe. *Translating Cell Biology into Therapeutic Advances in Alzheimer's Disease. Nature*, 1999, vol. 399 (6738), A23-A31
- Mahley et al. *J. Lipid Res.*, 1984, vol. 25, 1277-1284
- Hui et al. *J. Biol. Chem.*, 1984, vol. 259, 860-869
- Shelburne et al. *J. Clin. Invest.*, 1980, vol. 65, 652-658
- Dyer et al. *J. Biol. Chem.*, 1986, vol. 263, 10965
- Curtiss et al. *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 1379

- Mahley. *Science*, 1988, vol. 240, 822-830
- Zannis et al. *J. Lipid Res.*, 1982, vol. 23, 911
- Lambert et al. *Human Mol. Gen.*, 1998, vol. 7, 533
- Lambert et al. *Human Mol. Gen.*, 1998, vol. 7, 1511
- Weisgraber et al. *J. Biol. Chem.*, 1983, vol. 258, 12348-54
- Jacobsen. *Alzheimer's Disease: An Overview of Current and Emerging Therapeutic Strategies. Curr. Top. Med. Chem.*, 2002, vol. 2 (4), 343-352
- Giacobini. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2000, vol. 920, 321-327
- Greig et al. *Curr. Med. Res. Opin.*, 2001, vol. 17 (3), 159-165
- Bar-On et al. Kinetic and Structural Studies on the Interaction of Cholinesterases with the Anti-Alzheimer Drug Rivastigmine. *Biochem.* 2002, vol. 41 (11), 3555-3564
- Auriacombe et al. *Current Medical Research Opinion*, 2002, vol. 18, 129-138
- Burns et al. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, 1999, vol. 10 (3), 237-244
- Rosler et al. *BMJ*, 1999, vol. 318 (7184), 633-638
- Sjogren et al. *J. Neural. Transm.*, 2001, vol. 108 (4), 451-458
- Farlow et al. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1996, vol. 802, 101-110
- Farlow et al. *Neurology*, 1998, vol. 50 (3), 669-677
- Rigaud et al. *Eur. J. Neurol.*, 2000, vol. 7 (3), 255-256
- Poirier et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92 (26), 12260-12264
- MacGowan et al. *Int. J. Geriatr. Psychiatry*, 1998, vol. 13 (9), 625-630
- Aertsens et al. *Geriatr. Cogn. Disord.*, 2001, vol. 12 (2), 69-77
- Wilcock et al. *BMJ*, 2000, vol. 321 (7274), 1445-1449
- Nobili et al. *J. Nucl. Med.*, 2002, vol. 43 (8), 983-990
- Rosen et al. *Amer. J. Psych.*, 1984, vol. 141, 1358-1364
- Wenham PR et al. *Lancet*, 11 May 1991, vol. 337 (8750), 1158-9
- Zannis et al. *J. Lipid Res.*, 1982, vol. 23, 911
- Rall et al. *Methods in Enzymology*, 1986, vol. 128, 273-287
- Davignon et al. *Arteriosclerosis*, 1986, vol. 6, 1-21
- Warnick et al. *Clin. Chem.*, 1979, vol. 25, 279-284
- Pagnan et al. *J. Lipid Res.*, 1977, vol. 18, 613-622
- Utermann et al. *FEBS Lett.*, 1975, vol. 56, 352-355
- Swartz. *Biotechnology*, 1994, vol. 12, 408-409
- Paik et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 3445-3449
- Kwok et al. *Am. Biotechnol. Lab.*, 1980, vol. 8, 14-25
- Walker et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 392-396
- Walker et al. *Nuc. Acids Res.*, 1992, vol. 20, 1691-1698
- Kwok et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 1173-1177
- Guatelli et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 1874-1878
- Lizardi et al. *BioTechnology*, 1988, vol. 6, 1197-1202
- Lewis. *Genetic Engineering News*, 1992, vol. 12 (9), 1
- Wenham et al. *The Lancet*, 1991, vol. 337, 1158-1159
- Hixon et al. *J. Lipid Res.*, 1990, vol. 31, 545-548
- Houston et al. *Hum. Genet.*, 1989, vol. 83, 364-365
- Wenham et al. *Clin. Chem*, 1991, vol. 37, 241-244
- Zivelin et al. *Clin. Chem*, 1997, vol. 43 (9), 1657-1659
- Weiss. *Science*, 1991, vol. 254, 1292
- Decortet et al. *DNA & Cell Biology*, 1990, vol. 9 (6), 461-469
- Kohler ; Milstein. *Nature*, 1975, vol. 256, 495-497
- Rall et al. *Methods in Enzymol*, 1986, vol. 128, 273
- Huse. *Science*, 1989, vol. 246, 1275-1281
- Wenham et al. *Lancet*, 1991, vol. 337, 1158
- Kunkel et al. *Methods in Enzymol*, 1987, vol. 154, 367-382
- Maggio. *Enzyme-Immunoassay*. CRC Press, Inc, 1980
- Nilsson. *Methods Enzymol*, 1984, vol. 63, 56
- Egorov et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1975, vol. 72, 171
- Main et al. *J. Lipid Res.*, 1991, vol. 32, 183-187
- Shi. *Clin. Chem.*, 2001, vol. 47, 164-172
- Cox et al. *Hum. Mutat.*, 2001, vol. 17, 141-150
- Chan et al. *Genome Res.*, 1999, vol. 9, 492-499
- Ahmadian et al. *Anal. Biochem.*, 2000, vol. 280, 103-110
- Ryan et al. *Molecular Diagnosis*, 1999, vol. 4 (2), 135-144
- Lyamichev et al. *Nature Biotechnol.*, 1999, vol. 17, 292-296
- Stevens. *Mol. Diag.*, vol. 4, 309-317

- Barany et al. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 189-193
- Landegren et al. *Science*, 1986, vol. 241, 1077-1080
- Walker et al. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 392-396
- Winter et al. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 7575
- Meyers et al. *Science*, vol. 230, 1242
- Modrich, *Ann. Rev. Genet.*, 1991, vol. 25, 229-253
- Orita et al. *Genomics*, 1989, vol. 5, 874-879
- Humphries et al. *Molecular Diagnosis of Genetic Diseases*, 1996, 321-340
- Wartell. *Nucl. Acids Res.*, 1990, vol. 18, 2669-2706
- Sheffield et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1969, vol. 66, 232-236
- Ruaño et al. *Nucl. Acids Res.*, 1989, vol. 17, 8392
- Ruaño et al. *Nucl. Acids Res.*, 1991, vol. 19, 6877-6882
- Turki et al. *J. Clin. Invest.*, 1995, vol. 95, 1635-1641
- Hartl et al. *Principles of Population Genomics*, Sinauer Associates, 1997
- Michalatos-Beloin et al. *Nucl. Acids Res.*, 1996, vol. 24, 4841-4843