



PI02148218
PI02148218

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0214821-8

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0214821-8

(22) Data do Depósito: 09/12/2002

(43) Data da Publicação do Pedido: 03/07/2003

(51) Classificação Internacional: C12Q 1/68

(30) Prioridade Unionista: 10/12/2001 US 60/339,835

(54) Título: MÉTODO PARA DETERMINAR A RESPONSABILIDADE DE INDIVÍDUO COM DISTÚRBO PSICÓTICO AO TRATAMENTO COM LOPERIDONA

(73) Titular: NOVARTIS AG, Sociedade Suíça. Endereço: Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel, Suíça (CH).

(72) Inventor: SRIDHAR KUDARAVALLI; MIHAEL HRISTOS POLYMERPOULOS

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 07/07/2015, observadas as condições legais.

Expedida em: 7 de Julho de 2015.

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage
Diretora de Patentes Substituta



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODO PARA DETERMINAR A RESPONSABILIDADE DE INDIVÍDUO COM DISTÚRBO PSICÓTICO AO TRATAMENTO COM LOPERIDONA"**.

Fundamentos da Invenção

5 Campo da Invenção

A presente invenção refere-se aos campos da farmacologia, medicina e química medicinal e fornece métodos para tratar condições psíquicas incluindo a esquizofrenia e condições relacionadas. Em particular, esta invenção refere-se ao uso de análise genômica para determinar uma
10 responsividade à medicação antipsicótica incluindo loperidona e métodos para determinar estratégias de tratamento ideais.

Descrição da Técnica Relacionada

O Fator Neurotrófico Ciliar (CNTF) foi originalmente conhecido como um fator de sobrevivência para os neurônios ciliares de pintos *in vitro*
15 mas foi mais recentemente apresentado ser um fator de sobrevivência para diferentes tipos de células neuronais. O CNTF está envolvido com a prevenção da degeneração de axônios motores e é um membro da família da interleucina-6 citocina. Barbin et al. usou um ensaio de sobrevivência para os neurônios de gânglios ciliares embrionários de pinto para relatar a atividade
20 neurotrófica do CNTF dos olhos de pintos. Ver. Barbin, G et al., *J. Neurochem.* 43:1468-1478, 1984. O CNTF foi também mostrado ter ações sobre os neurônios simpáticos e sensoriais neste estudo.

O gene do CNTF também sustenta a esperança para o tratamento de esclerose lateral amiotrófica (ALS) e outros distúrbios similarmente
25 relacionados. Em camundongos pmn/pmn homozigotos um distúrbio ocorre em que os membros traseiros possuem uma neuropatia motora progressiva que se torna evidente no final da terceira semana pós-natal. Todos os camundongos falecem de seis a sete semanas após o começo da paralisia respiratória. Sendtner et al. tratou os camundongos com CNTF e com êxito
30 melhorou a função motora e reduziu os sintomas morfológicos da degeneração neural mesmo quando as alterações degenerativas já estavam presentes. Ver, Sendtner et al., *Nature* 358: 502-504, 1992.

Maior compreensão foi ganha quando a expressão do gene do CNTF foi eliminada nos camundongos mediante a recombinação homóloga e a atrofia progressiva e a perda dos neurônios motores ainda ocorriam, acompanhadas por uma pequena redução na resistência muscular, ver, Ma-
su et al. *Nature* 365: 27-32, 1993. Os autores deste estudo, mencionaram
que estes resultados demonstram que a expressão do gene não é essencial
para o desenvolvimento dos neurônios motores espinhais como determina-
do por critérios morfológicos, mas que é essencial para a manutenção da
função nos neurônios motores no período pós-natal.

Takahashi et al. tinham descobertas similares na falta de efeitos
nos camundongos nocauteados pelo CNTF. Eles observaram que aproxi-
madamente 2,5 % da população Japonesa são homozigotas para mutações
que inativam o gene do CNTF, ver, Takahashi et al. *Nature Genet.* 7: 79-84,
1994. Aqueles que necessitam de CNTF dão a impressão de não serem ad-
versamente afetados e não têm apresentado quaisquer defeitos neurológi-
cos relacionados.

As subunidades receptoras do CNTF compartilham seqüências
similares com o receptor de leptina (LEP). Estudos sugerem que as citocinas
tanto do CNTF quanto da LEP possuam a capacidade de sinalizar os cen-
tros de saciedade hipotalâmicos. Estes resultados viriam após a administra-
ção sistêmica de CNTF e LEP aos camundongos ob/ob, que resultou em
indução rápida do gene de resposta primária tis-11 no núcleo arqueado. Ao
contrário da leptina, o CNTF também reduziu os fenótipos relacionados com
a obesidade em camundongos db/db, que necessitam de um receptor de
leptina funcional, e em camundongos com obesidade induzida por dieta, que
são parcialmente resistentes às ações da leptina.

A proteína do CNTF é armazenada dentro das células gliais,
talvez aguardando a liberação por algum mecanismo provocado por dano.
Pode não ser essencial para o desenvolvimento e pode, de fato, atuar na
resposta ao dano ou algum outro tipo de stress. O CNTF foi caracterizado
como um fator trófico para os neurônios motores no gânglio ciliar e cordão
espinhal.

Polimorfismo no Gene do Cntf

Um polimorfismo no gene do CNTF foi identificado. O gene do CNTF está localizado no 11q12.2 e o polimorfismo é 103 G>A na seqüência do GenBank X55890 (Versão 1) (ver PubMed: 9285965). Uma mutação em
 5 um lugar aceitor de encaixe fez com que o mRNA se encaixa-se incorretamente, desse modo abolindo a expressão da proteína do CNTF. A mudança de nucleotídeo foi uma transição de G a A na posição -6 do lugar receptor de encaixe, levando a uma mudança de estrutura do aminoácido 39, resultando em um códon de interrupção de 24 aminoácidos a jusante. O mRNA
 10 irregular foi esperado codificar uma proteína truncada de 62 aminoácidos alongada (FS63 TER).

A análise das amostras de tecido e a transfecção de minigenes do CNTF nas células cultivadas demonstraram que o alelo submetido a mutação expressou somente a espécie de mRNA submetido a mutação. O
 15 gene mutante homozigoto não é trasladado em proteína como é mostrado pela descoberta que os anticorpos que reconhecem tanto o CNTF normal quanto o submetido a mutação apresentam falta completa de imunorreatividade do CNTF no tecido nervoso periférico de um paciente mutante homozigoto. Ver Takahashi et al. *Nature Genet.* 7: 79-84, 1994.

Distúrbios Psicóticos

A psicose exige uma tremenda cota emocional e econômica dos pacientes, suas famílias e a sociedade como um todo. As condições psicóticas, tais como esquizofrenia e distúrbios relacionados (por exemplo, distúrbio esquizoafetivo), e incluindo distúrbios afetivos (distúrbios do humor) com
 25 sintomas psicóticos (por exemplo, Distúrbio Bipolar) são complexas e doenças heterogêneas de etiologia duvidosa que afligem uma grande porcentagem de todas as populações pelo mundo inteiro.

A esquizofrenia é caracterizada como tendo tanto "sintomas positivos" (alucinações, delusões, desorganização conceitual) quanto "sintomas negativos" (apatia, retração social, afeto e pobreza de linguagem). A
 30 atividade anormal da dopamina neurotransmissora é uma indicação de esquizofrenia. A atividade dopaminérgica é reduzida no sistema mesocortical

(resultando em sintomas negativos) e é acentuada no sistema mesolímbico (resultando em sintomas positivos ou psicóticos). Vários outros neurotransmissores são envolvidos, incluindo serotonina, glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA).

5 As drogas antipsicóticas, em uma forma ou de outra, têm sido a muito tempo a base de tratamento dos distúrbios psicóticos. Estas drogas são às vezes usadas em combinação com uma medicação reguladora do humor tal como lítio ou um antidepressivo. Por muitos anos, a esquizofrenia foi tratada com drogas antipsicóticas clássicos, os neurolépticos, que blo-
10 queiam os receptores centrais da dopamina. Os neurolépticos são eficazes para o tratamento dos sintomas positivos da esquizofrenia, mas possuem pouco ou nenhum efeito sobre os sintomas negativos. A capacidade destas drogas em antagonizar os receptores de dopamina correlata com a eficácia antipsicótica. As drogas neurolépticas incluem fenotiazinas incluindo alifáti-
15 cos (por exemplo, clorpromazina), piperidinas (por exemplo, tioridazina), e piperazinas (por exemplo, flufenazina); butirofenonas (por exemplo, haloperidol); tioxantenos (por exemplo, flupentixol); oxoindóis (por exemplo, molindona); dibenzoxazepinas (por exemplo, loxapina) e difenilpiperidinas (por exemplo, pimozida). Infelizmente, os sintomas negativos resistentes aos
20 neurolépticos respondem pela maioria das incapacidades sociais e vocacionais causadas pela esquizofrenia. Além disso, os neurolépticos causam sintomas extrapiramidal, incluindo rigidez, tremor bradicinesia (movimento lento), e bradifrenia (pensamento lento), assim como discinesias tardia e distonias. Para o tratamento de psicose com medicações, ver, Textbook of Psycho-
25 pharmacology, Schatzberg AF e Nemeroffco, Editors, American Psychiatric Press. Wash. D.C. 1995.

 Progresso no tratamento de condições psicóticas foi obtido através da introdução de novos agentes antipsicóticos. O perfil de efeito colateral destes antipsicóticos atípicos é muito superior a aqueles dos agentes
30 tradicionais. Os antipsicóticos atípicos são uma classe diferente de drogas antipsicóticas que possuem um perfil de ligação do receptor diferente e eficácia contra os sintomas de esquizofrenia. O aspecto essencial de um an-

tipicótico atípico é sintomas extrapiramidais menos agudos, especialmente distonias, associados com terapia quando comparado com um antipsicótico típico tal como haloperidol. A clozapina, o antipsicótico atípico prototípico, difere dos antipsicóticos típicos com as seguintes características: (1) maior
5 eficácia no tratamento de psicopatologia global em paciente com esquizofrenia não responsiva aos antipsicóticos típicos; (2) maior eficácia no tratamento de sintomas negativos de esquizofrenia; e (3) aumentos menos frequentes e quantitativamente menores nas concentrações de prolactina no soro associados com terapia (Beasley, et al., Neuropsychopharmacology,
10 14(2), 111-123, (1996)).

Antipsicóticos atípicos ligam os receptores centrais de serotonina 2 (5-HT₂) além dos receptores de dopamina D₂. Ao contrário dos neurolépticos, eles melhoram os sintomas negativos assim como os positivos. Eles causam sintomas extrapiramidais mínimos e raramente causam disci-
15 nesias tardia, acatisia ou reações distônicas. A primeira droga antipsicótica atípica aprovada para o tratamento de esquizofrenia foi clozapina. A clozapina é eficaz para o tratamento de esquizofrenia, especialmente para pacientes que não respondem à terapia neuroléptica tradicional.

O tratamento de distúrbios psicóticos com agentes antipsicóticos
20 tem constantemente melhorado através dos anos. No entanto, até agora não houve nenhum meio que não tentativas sucessivas, para determinar quais pacientes responderão a um agente antipsicótico e que nível de dose um dado paciente pode requer para produzir uma resposta terapêutica sem efeitos colaterais severos. Uma vez que todos os agentes antipsicóticos,
25 mesmo aqueles atípicos mais novos, possuem efeitos colaterais significativos incluindo sintomas extrapiramidais, tais como rigidez, tremor, bradicinesia (movimento lento), e bradifrenia (pensamento lento), assim como discinesias tardia e distonias, este período de "tentativas sucessivas" pode ser de consumo de tempo, desagradável e mesmo perigoso para o paciente e
30 de aumento da probabilidade de não submissão. Estes efeitos colaterais e efeitos tóxicos são dependentes da dose. Portanto existe uma grande necessidade para se desenvolver meios para se determinar quer sim, quer não

um paciente responderá a um agente antipsicótico e que faixa de dose será eficaz em um paciente particular enquanto minimiza os efeitos colaterais.

Sumário da Invenção

A presente invenção responde a esta necessidade por fornecer métodos de tratamento de um paciente sofrendo ou suscetível a um distúrbio psicótico, incluindo mas não limitado a esquizofrenia e distúrbio do humor com sintomas psicóticos, compreendendo determinar com relação as duas cópias do gene do CNTF presentes no indivíduo, a identidade do par de nucleotídeo no sítio polimórfico 103 G>A, (o gene CNTF está localizado na 11q12.2, o polimorfismo é 103 G>A na sequência do GenBank X55890 (Versão 1)). Esta variação de nucleotídeo resulta na criação de um novo lugar aceptor de encaixe, um mRNA alterado e uma proteína aberrante resultante (FS63 TER), ver, Pub Med ID No. 9285965. A determinação de tratamento baseia-se no conhecimento que se ambos os pares de nucleotídeo forem G ou se ambos os pares de nucleotídeo forem A então o indivíduo será responsivo ao tratamento com medicações antipsicóticas incluindo mas não limitado à loperidona. Se um par de nucleotídeo for A e o outro for G pode ser esperado que o indivíduo será menos responsivo à medicações antipsicóticas, incluindo mas não limitado à loperidona e pode requerer uma dose elevada ou uma terapia adjuntiva além de, ou em lugar de um antipsicótico. Na base desta informação ao indivíduo pode ser administrado uma quantidade eficaz de uma medicação antipsicótica apropriada designada para minimizar os efeitos colaterais e para maximizar a resposta e submissão do paciente.

Portanto, em um aspecto, esta invenção fornece um método de tratamento de um distúrbio psicótico em um paciente com necessidade de tal tratamento que compreende, determinar as duas cópias do gene do CNTF presente no indivíduo, a identidade do par de nucleotídeo no sítio polimórfico 103 G>A na referência da sequência do GenBank No. X55890 (Versão 1) em que, se ambos os pares de nucleotídeos forem G ou se ambos forem A então o indivíduo é tratado com loperidona e em que, se um par de nucleotídeo for A e o outro for G então o indivíduo é tratado com terapia

alternativa ou com loperidona com combinação com uma terapia alternativa.

Em um outro aspecto, esta invenção fornece um método para tratar um distúrbio psicótico em um paciente com necessidade de tal tratamento que compreende, analisar a presença de proteína do CNTF nos ditos fluidos ou tecidos corporais do paciente, em que, se a proteína do CNTF for encontrada nos níveis normais ou for indetectável, indicando genótipo GG ou AA respectivamente, o paciente é tratado com loperidona, e se a proteína do CNTF for encontrada nos níveis intermediários o paciente é tratado com terapia alternativa ou com loperidona em combinação com uma terapia alternativa.

Em um outro aspecto, esta invenção fornece um método para tratar um distúrbio psicótico em um paciente com necessidade de tal tratamento que compreende, detectar um nível de expressão de mRNA correspondente à variante G do gene do CNTF no sítio polimórfico 103 G>A na referência da sequência do GenBank No. X55890 (Versão 1), detectar um nível de expressão de mRNA correspondente à variante A do gene do CNTF no sítio polimórfico 103 G>A na referência da sequência do GenBank No. X55890 (Versão 1), comparar os níveis de mRNA detectados em (a) e (b) acima em que, se (a) for duas vezes ou mais o valor de (b), ou se (b) for duas vezes ou mais o valor de (a), o paciente é tratado com loperidona (medicação antipsicótica), e se (a) e (b) forem de valor similar, o paciente é tratado com terapia alternativa ou com loperidona em combinação com uma terapia alternativa.

Em uma outra modalidade, esta invenção fornece um método para selecionar pacientes para inclusão em um estudo clínico de uma medicação antipsicótica compreendendo, determinar as duas cópias do gene do CNTF presente no indivíduo, a identidade do par de nucleotídeo no sítio polimórfico 103 G>A na referência da sequência do GenBank No. X55890 (Versão 1) em que, o indivíduo é incluído no estudo se ambos os pares de nucleotídeos forem G ou ambos os pares de nucleotídeo forem A, e o indivíduo é excluído do estudo se um par de nucleotídeo for A e o outro for G.

Outro aspecto da invenção, é um kit para uso na determinação

da estratégia de tratamento para um paciente com um distúrbio psicótico que compreende, um anticorpo capaz de reconhecer e se ligar ao produto de expressão do polipeptídeo do gene do CNTF, um recipiente adequado para conter o dito anticorpo e uma amostra de fluido corporal do dito indivíduo em que o anticorpo pode fazer contato com o polipeptídeo do CNTF se estiver presente, e meio de detectar a combinação do dito anticorpo com o polipeptídeo do CNTF e também incluindo instruções para uso do kit.

Um outro aspecto da invenção, é um kit para uso na determinação da estratégia de tratamento para um paciente com um distúrbio psicótico compreendendo, um polinucleotídeo capaz de reconhecer e se ligar ao produto de expressão de mRNA do gene do CNTF, um recipiente adequado para conter o dito polinucleotídeo e uma amostra de fluido corporal do dito indivíduo em que o dito polinucleotídeo pode fazer contato com o mRNA do CNTF, se estiver presente, e meio para detectar a combinação do dito polinucleotídeo com o mRNA do CNTF e também incluindo instruções para uso do kit.

Em outro aspecto, esta invenção fornece um kit para uso na determinação de uma estratégia de tratamento para um paciente com um distúrbio psicótico compreendendo, um polinucleotídeo capaz de reconhecer e se ligar a alguma parte da seqüência do DNA do gene do CNTF, um recipiente adequado para conter o dito polinucleotídeo e uma amostra de fluido corporal do dito indivíduo em que o dito polinucleotídeo pode fazer contato com a seqüência de DNA do CNTF se estiver presente, e meio para detectar a combinação do dito polinucleotídeo com a seqüência de dNA do CNTF e incluindo instruções para uso do kit.

Em mais um aspecto, esta invenção fornece um método para determinar a responsividade de um indivíduo com um distúrbio psicótico para tratamento com loperidona, compreendendo, determinar as duas cópias do gene do CNTF presente no indivíduo, a identidade de um par de nucleotídeo em um sítio polimórfico na região do gene do CNTF que está em desequilíbrio de ligação com o sítio polimórfico no CNTF 103 G>A na referência da seqüência do GenBank No. X55890 (Versão 1); e indicar o indivi-

duo a um bom grupo de respondedores se o par de nucleotídeo em um sítio polimórfico na região do gene do CNTF que está em desequilíbrio de ligação com o sítio polimórfico em 103 G>A indicar que, no sítio polimórfico do CNTF em 103 G>A, ambos os pares de nucleotídeo são GC ou ambos os
5 pares são AT e em um grupo respondedor inferior se dito par de nucleotídeo indicar que um par é AT e um par é GC no sítio do CNTF 103 G>A.

Em um outro aspecto, esta invenção fornece um kit para a identificação de um padrão de polimorfismo do paciente no sítio polimórfico do CNTF em 103 G>A, dito kit compreendendo um meio para se determinar um
10 padrão de polimorfismo genético no sítio polimórfico do CNTF em 103 G>A.

Em outra modalidade, a invenção diz respeito a um kit descrito no parágrafo precedente, que ainda compreende um meio de coleta da amostra de DNA.

Uma outra modalidade da invenção é um kit descrito nos parágrafos precedentes, em que o meio para se determinar um padrão de polimorfismo genético no sítio polimórfico do CNTF em 103 G>A compreende pelo menos um oligonucleotídeo de determinação do genótipo do CNTF.
15

Uma outra modalidade da invenção é um kit de acordo com os parágrafos precedentes, em que o meio para se determinar um padrão de polimorfismo genético no sítio polimórfico do CNTF em 103 G>A compreende dois oligonucleotídeos de determinação do genótipo do CNTF.
20

Em uma outra modalidade, a invenção diz respeito a um kit como descrito nos parágrafos precedentes, em que o meio para se determinar um padrão de polimorfismo genético no sítio polimórfico do CNTF em
25 103 G>A compreende pelo menos uma composição iniciadora relativa ao genótipo do CNTF.

Uma outra modalidade da invenção é um kit descrito nos parágrafos precedentes, em que a composição iniciadora relativa ao genótipo do CNTF compreende pelo menos duas séries de pares iniciadores específicos
30 do alelo.

Outra modalidade da invenção fornece um kit de acordo com os parágrafos precedentes, em que os dois oligonucleotídeos de determinação

do genótipo do CNTF são embalados em recipientes separados.

Uma outra modalidade da invenção é um método, em que um kit de acordo com as modalidades anteriormente mencionadas é usado para determinar as duas cópias do gene do CNTF presente no indivíduo, a identidade do par de nucleotídeo no sítio polimórfico referência da sequência do GenBank No. X55890 (Versão 1) e/ou para determinar as duas cópias do gene do CNTF presente no indivíduo, a identidade de um par de nucleotídeo em um sítio polimórfico na região do gene do CNTF que está em desequilíbrio de ligação com o sítio polimórfico no CNTF 103 G>A na referência da sequência do GenBank No. X55890 (Versão 1).

Outro aspecto da invenção é um kit para a identificação de expressão do mRNA do gene do CNTF, dito kit compreendendo um meio para se determinar o produto de mRNA do gene do CNTF.

Uma outra modalidade da presente invenção é um kit descrito no parágrafo precedente, em que o meio para se determinar o produto de mRNA do gene do CNTF compreende um polinucleotídeo capaz de se ligar ao produto de expressão de mRNA do gene do CNTF.

Em uma outra modalidade, esta invenção fornece um kit para a identificação da expressão de mRNA do gene do CNTF de acordo com os parágrafos precedentes, em que o meio para se determinar o produto de mRNA do gene do CNTF compreende pelo menos um polinucleotídeo específico para uma das variantes do gene do CNTF no sítio polimórfico 103 G>A.

Em uma outra modalidade, a invenção fornece um kit para a identificação da expressão de mRNA do gene do CNTF, em que o polinucleotídeo é específico para a expressão de mRNA da variante G do gene do CNTF no sítio polimórfico 103 G>A.

Outra modalidade da invenção é um kit para a identificação da expressão de mRNA do gene do CNTF, em que o polinucleotídeo é específico para a expressão de mRNA da variante G do gene do CNTF no sítio polimórfico 103 G>A.

Em outra modalidade, a invenção fornece um kit de acordo com

o parágrafo precedente, em que o polinucleotídeo é específico para a codificação do mRNA irregular para uma proteína truncada de 62 aminoácidos.

Em mais uma modalidade, a invenção fornece um kit para a identificação da expressão de mRNA do gene do CNTF como descrito nas reivindicações precedentes, em que o polinucleotídeo é a ligação do produto da expressão de mRNA da variante G ou A do gene do CNTF sob condições de hibridização severas.

Uma outra modalidade da invenção é um kit para a identificação da expressão de mRNA do gene do CNTF descrito nas reivindicações precedentes, em que o meio para se determinar o produto de mRNA do gene do CNTF compreende pelo menos dois polinucleotídeos, em que um polinucleotídeo é específico para a expressão de mRNA da variante G do gene do CNTF no sítio polimórfico 103 G>A, e o outro polinucleotídeo é específico para a expressão de mRNA da variante A do gene do CNTF no sítio polimórfico 103 G>A.

Em uma outra modalidade da invenção, um kit descrito no parágrafo precedente é fornecido, em que dois polinucleotídeos são embalados em recipientes separados.

Uma outra modalidade da invenção é um método, em que uma das modalidades anteriormente mencionadas para a identificação da expressão de mRNA do gene do CNTF da invenção é usada para ou (a) detectar um nível de expressão de mRNA correspondente à variante G do gene do CTNF no sítio polimórfico 103 G>A na referência da sequência do GenBank No. X55890 (Versão 1), e/ou (b) detectar um nível de expressão de mRNA correspondente à variante A do gene do CTNF no sítio polimórfico 103 G>A na referência da sequência do GenBank No. X55890 (Versão 1).

Em outro aspecto, esta invenção fornece um kit para a identificação de uma proteína do CNTF do paciente compreendendo um meio para se detectar o produto de expressão do polipeptídeo do gene do CNTF.

Uma outra modalidade da invenção é um kit descrito no parágrafo precedente, em que o meio compreende um anticorpo que reconhece o polipeptídeo do CNTF.

Em uma outra modalidade, a invenção fornece um kit de acordo com o parágrafo precedente, em que a ligação do anticorpo está dentro de uma faixa K_D de $10e^{-6}$ a $10e^{-13}$, preferivelmente dentro de uma faixa de $10e^{-8}$ a $10e^{-12}$.

5 Outra modalidade da invenção é um método, em que um dos kits anteriormente mencionados para a identificação de um nível de proteína do CNTF do paciente é usado para analisar a presença da proteína do CNTF nos fluidos e tecidos corporais do paciente.

Em outra modalidade, esta invenção fornece um kit de acordo
10 com as reivindicações precedentes, ainda compreendendo um meio para coletar um fluido corporal ou uma amostra de tecido.

Outras modalidades da invenção fornecem um método de tratamento de um distúrbio psicótico em um paciente com necessidade de tal tratamento, um método para selecionar pacientes para inclusão em um estudo clínico de uma medicação antipsicótica, ou um método para determinar
15 a responsividade de um indivíduo com um distúrbio psicótico para o tratamento com loperidona, em que dito método é executado *ex vivo*.

Breve Discussão dos Desenhos

A Figura 1 mostra a mudança percentual média em GG TO-TPANSS e não GG TOTPANSS como debatido no Exemplo 1.
20

Descrição das Modalidades Preferidas

Assim, em um primeiro aspecto, a invenção fornece métodos de determinar a responsividade de um indivíduo com um distúrbio psicótico para tratamento com uma medicação antipsicótica incluindo mas não limitada à loperidona. Estes métodos compreendem a determinação do genótipo ou haplótipo do gene do CNTF e a criação da determinação de responsividade com base na presença ou ausência de uma ou mais variantes polimórficas no gene do CNTF. O gene do CNTF está localizado no 11q12.2 e o polimorfismo é 103 G>A na sequência do GenBank X55890 (Versão 1). Esta
25 variação de nucleotídeo resulta na criação de um novo lugar aceptor de encaixe, um mRNA alterado e uma proteína aberrante resultante, ver, Pub Med ID No. 9285965.
30

A detecção destes polimorfismos pode ser usada para determinar ou prever a responsividade do indivíduo a um agente antipsicótico particular. Além disso, os polimorfismos podem ser detectados diretamente ou mediante a detecção do mRNA característico do gene variante polimórfico quando oposto ao tipo de CNTF mais comum.

Além do mais, a detecção do produto de expressão de polipeptídeo (proteína) do gene do CNTF nos fluidos ou tecidos corporais pode ser usada para determinar a presença ou ausência do polimorfismo e, o nível relativo do produto de expressão de polipeptídeo pode ser usado para determinar se o polimorfismo está presente em um estado homozigoto ou heterozigoto e portando a responsividade do paciente aos agentes antipsicóticos.

Portanto, uma modalidade da presente invenção é um método para a determinação da presença ou ausência do polimorfismo em um paciente mediante a identificação da presença do produto de expressão da proteína do gene do CNTF. Estudos têm mostrado que o mRNA da variante A não é trasladada em um produto de expressão de polipeptídeo. Portanto, se quantidades normais da proteína forem observadas nos fluidos corporais ou amostras de tecido do paciente, então o paciente é suposto de ter a variante G homozigota mais comum e responderá aos agentes antipsicóticos. Se o nível de expressão de proteína do CNTF for indetectável, então o paciente é suposto de ter o polimorfismo A homozigoto e deve ser esperado também ser um respondedor de medicação antipsicótica. Entretanto, se o paciente for observado ter um nível intermediário da proteína nos fluidos do corpo ou amostras de tecido, então o paciente será esperado ter polimorfismo heterozigoto com um alelo contendo G e um contendo A no sítio polimórfico. Neste caso o paciente seria esperado ser um não respondedor à medicação antipsicótica, incluindo loperidona, e o tratamento com um antipsicótico tal como loperidona sozinho não deve ser indicado.

Como aqui usado, o termo "nível normal" quando usado na referência ao nível do produto de expressão de polipeptídeo do gene do CNTF medido em um fluido corporal ou tecido corporal significa que o nível medido

está dentro de um desvio padrão do nível médio do produto de expressão de polipeptídeo do gene do CNTF determinado em pelo menos 10 indivíduos conhecidos de terem a variante G em ambos os locos no sítio polimórfico 103 G>A no gene do CNTF humano (na seqüência com o número de acesso do GenBank X55890 (Versão 1)) quando determinado no mesmo tipo de fluido ou tecido corporal e pela mesma técnica de análise.

Como aqui usado o termo "nível intermediário" quando usado em referência ao nível do produto de expressão do polipeptídeo do gene do CNTF medido em um fluido corporal ou tecido corporal significa que o nível medido é mais do que um desvio padrão abaixo do nível médio de produto de expressão de polipeptídeo do gene do CNTF determinado em pelo menos 10 indivíduos conhecidos por terem a variante G em ambos os locos no sítio polimórfico 103 G>A no gene do CNTF humano (na seqüência com o número de acesso do GenBank X55890 (Versão 1)) quando determinado no mesmo tipo de fluido ou tecido corporal e pela mesma técnica de análise.

Em outra modalidade, a presente invenção fornece métodos para se determinar uma responsividade do paciente aos agentes antipsicóticos e desenvolver estratégias de tratamento para um paciente com um distúrbio psicótico. Estes métodos compreendem a medição da quantidade e relação de mRNAs correspondentes à variante mais comum do gene do CNTF, isto é, G no sítio 103, versus a variante polimórfica menos comum com A no lugar de G. Nesta modalidade a relação dos dois mRNAs é determinada em uma amostra do fluido corporal ou tecido corporal do paciente. Se todo o mRNA for da variante G então o paciente será responsivo ao tratamento com agentes antipsicóticos incluindo loperidona. Se todo o mRNA for da variante A então o paciente também será responsivo ao tratamento com agentes antipsicóticos tais como loperidona. No entanto, se ambos os tipos de mRNA forem observados, então o paciente é heterozigoto para o polimorfismo e será esperado ser fracamente responsivo ao tratamento com medicação antipsicótica, incluindo loperidona e estratégias de tratamento serão consideradas.

Uma pessoa versada na técnica facilmente reconhecerá que,

além dos polimorfismos específicos aqui apresentados, qualquer polimorfismo que esteja em desequilíbrio de ligação com o dito polimorfismo pode também servir como um marcador substituto indicando responsividade ao mesmo droga ou terapia como atua o polimorfismo de nucleotídeo isolado (SNP) que está em desequilíbrio de ligação com ele. Portanto, qualquer SNP em desequilíbrio de ligação com os SNPs apresentados neste relatório descritivo, pode ser usado e é destinado a ser incluído nos métodos da invenção.

Identificação e caracterização de SNPs

Muitas técnicas diferentes podem ser usadas para identificar e caracterizar os SNPs, incluindo a análise do polimorfismo de conformação de filamento único, análise heterodúplex por cromatografia líquida de alto desempenho desnaturante (DHPLC), seqüenciamento de DNA direto e métodos computacionais, ver Shi MM, *Clin Chem* 2001, 47: 164-172. Graças à abundância de informação de seqüência nas bases de dados públicas, instrumentos computacionais podem ser usados para identificar os SNPs *in silico* mediante o alinhamento das seqüências independentemente submetidas por um dado gene (ou cDNA ou seqüências genômicas). A comparação de SNPs obtidos experimentalmente e por métodos *in silico* mostrou que 55 % de SNPs candidatos observados por SNPFinder (http://lpgws.nci.nih.gov:82/perl/snp/snp_cgi.pl) foram também descobertos experimentalmente, ver, Cox et al., *Hum Mutal* 2001, 17: 141-150. No entanto estes métodos *in silico* podem apenas encontrar 27 % dos SNPs verdadeiros.

Os métodos de tipificação do SNP mais comuns correntemente incluem hibridização, extensão do iniciador e métodos de clivagem. Cada um destes métodos deve ser conectado a um sistema de detecção apropriado. As tecnologias de detecção incluem polarização fluorescente (ver Chan X et al. *Genome Res* 1999, 9: 492-499), detecção luminométrica de liberação de pirofosfato (pirosseqüenciamento), (ver Ahmadiian A et al. *Anal Biochem* 2000, 280:103-10), análises de clivagem com base na transferência de energia de ressonância fluorescente (FRET), DHPLC, e espectrometria de massa, (ver Shi MM, *Clin Chem* 2001, 47:164-172 e Patente U.S. número

6.300.076 B1). Outros métodos de detecção e caracterização de SNPs são aqueles apresentados nas Patentes U.S. números 6.297.018 B1 e 6.300.063 B1. As revelações das referências acima são aqui incorporadas por referência em sua totalidade.

5 Em uma modalidade particularmente preferida a detecção do polimorfismo pode ser realizada por meio da assim chamada tecnologia INVADER® (disponível da Third Wave Technologies Inc. Madison, Wis.). Nesta análise, um oligonucleotídeo "invasor" a montante específico e uma sonda a jusante parcialmente sobreposta juntos formam uma estrutura específica
10 quando ligados ao modelo de DNA complementar. Esta estrutura é reconhecida e cortada em um sítio específico pela enzima Cleavase, e isto resulta na liberação do retalho 5' do oligonucleotídeo da sonda. Este fragmento depois serve como o oligonucleotídeo "invasor" com respeito aos alvos secundários sintéticos e sondas de sinal fluorescentemente rotuladas secundárias sintéticas contidas na mistura de reação. Isto resulta em clivagem específica das sondas de sinal secundárias pela enzima Cleavase. O sinal de fluorescência é gerado quando esta sonda secundária, rotulada com moléculas de tinta capazes de transferir energia de ressonância fluorescente, é clivada. As Cleavases possuem requisitos estritos em relação à
15 estrutura formada pelas seqüências de DNA sobrepostas ou retalhos e podem, portanto, ser usadas para especificamente detectar más combinações imediatamente a montante do sítio de clivagem no filamento de DNA a jusante. Ver Ryan D et al. *Molecular Diagnosis* Vol. 4 nº 2 1999:135-144 e Lyamichev V et al. *Nature Biotechnology* Vol 17 1999: 292-296, ver também
20 as Patentes U.S. números 5.846.717 e 6.001.567 (cujas revelações são aqui incorporadas por referência em sua totalidade).

 Em algumas modalidades, uma composição contém dois ou mais oligonucleotídeos de genotipação diferentemente rotulados para simultaneamente investigar a identidade dos nucleotídeos em dois ou mais
30 sítios polimórficos. É também contemplado que as composições iniciadoras podem conter duas ou mais séries de pares iniciadores específicos do alelo para permitir o direcionamento e amplificação simultâneas de duas ou mais

regiões contendo um sítio polimórfico.

Os oligonucleotídeos de genotipação do CNTF da invenção podem também ser imobilizados ou sintetizados em uma superfície sólida tal como uma micropastilha, gota ou lâmina de vidro (ver, por exemplo, WO 98/20020 e WO 98/20019). Tais oligonucleotídeos de genotipação imobilizados podem ser usados em uma variedade de análises de detecção de polimorfismo, incluindo mas não limitado às análises de hibridização da sonda e de extensão da polimerase. Os oligonucleotídeos de genotipação do CNTF imobilizados da invenção podem compreender uma organização ordenada de oligonucleotídeos designados para rapidamente examinar uma amostra de DNA com relação aos polimorfismos em múltiplos genes ao mesmo tempo.

Um iniciador de oligonucleotídeo específico do alelo da invenção possui um nucleotídeo terminal 3', ou preferivelmente um nucleotídeo penúltimo 3', que é complementar a apenas um nucleotídeo de um SNP, desse modo atuando como um iniciador para a extensão mediada da polimerase somente se o alelo contendo este nucleotídeo estiver presente. Os iniciadores de oligonucleotídeo específico do alelo (ASO) que hibridizam ou o filamento de codificação ou de não codificação são contemplados pela invenção. Um iniciador de ASO para detectar os polimorfismos do gene do CNTF podem ser desenvolvidos usando as técnicas conhecidos por aqueles versados na técnica.

Outros oligonucleotídeos de genotipação da invenção hibridizam em uma região alvo localizada em um a vários nucleotídeos a jusante de um dos novos sítios polimórficos aqui identificados. Tais oligonucleotídeos são úteis nos métodos de extensão do iniciador mediado pela polimerase para detectar um dos novos polimorfismos aqui descritos e portanto tais oligonucleotídeos de genotipação são referidos aqui como "oligonucleotídeos de extensão do iniciador". Em uma modalidade preferida, o terminal 3' de um oligonucleotídeo de extensão do iniciador é um deoxinucleotídeo complementar ao nucleotídeo localizado imediatamente adjacente ao sítio polimórfico.

Em outra modalidade, a invenção fornece um kit compreendendo pelo menos dois oligonucleotídeos de genotipação embalados em recipientes separados. O kit pode também conter outros componentes tais como tampão de hibridização (onde os oligonucleotídeos devem ser usados como uma sonda) embalado em um recipiente separado. Alternativamente, onde os oligonucleotídeos devem ser usados para amplificar uma região alvo, o kit pode conter, embalado em recipientes separados, uma polimerase e um tampão de reação otimizado para extensão do iniciador mediado pela polimerase, tal como PCR.

As composições de oligonucleotídeo descritas acima e os kits são úteis nos métodos de genotipação e/ou haplotipação do gene do CNTF em um indivíduo. Como aqui usado, os termos "genótipo do CNTF" e "haplótipo do CNTF" significam o genótipo ou haplótipo contendo o par de nucleotídeo ou o nucleotídeo, respectivamente, que está presente em um ou mais dos sítios polimórficos aqui descritos e podem opcionalmente também incluir o par de nucleotídeo ou o nucleotídeo presente em um ou mais sítios polimórficos adicionais no gene do CNTF. Os sítios polimórficos adicionais podem ser sítios polimórficos correntemente conhecidos ou sítios que são subsequentemente descobertos.

Uma modalidade do método de genotipação envolve isolar do indivíduo uma mistura de ácido nucléico que compreende as duas cópias do gene do CNTF, ou um fragmento deste, que estão presentes no indivíduo, e determinar a identidade do par de nucleotídeo em um ou mais dos sítios polimórficos nas duas cópias para determinar um genótipo do CNTF no indivíduo. Como será facilmente compreendido pelo versado, as duas "cópias" de um gene em um indivíduo podem ser o mesmo alelo ou podem ser alelos diferentes. E uma modalidade particularmente preferida, o método de genotipação compreende a determinação da identidade do par de nucleotídeo em cada sítio polimórfico.

Tipicamente, a mistura de ácido nucléico ou proteína é isolada a partir de uma amostra biológica tomada do indivíduo, tal como uma amostra de sangue ou amostra de tecido. As amostras de tecido adequadas incluem

o sangue integral, sêmen, saliva, lágrimas, urina, material fecal, suor, esfregaço bucal, pele, e biópsias de tecidos orgânicos específicos tais como tecido muscular ou nervoso e cabelo. A mistura de ácido nucléico pode ser compreendida de DNA genômico, mRNA, ou cDNA e nos últimos dois casos, a amostra biológica deve ser obtida de um órgão em que o gene do CNTF é expresso. Além disso será compreendido pelo versado que as preparações de mRNA ou cDNA não devem ser usadas para detectar polimorfismos localizados nos íntrons ou nas regiões não transcritas 5' e 3'. Se um fragmento de gene do CNTF for isolado, deve conter o(s) sítio(s) polimórfico(s) a ser(em) genotipado(s).

Uma modalidade do método de haplotipação compreende isolar do indivíduo uma molécula de ácido nucléico contendo somente uma das duas cópias do gene do CNTF, ou um fragmento deste, que está presente no indivíduo e determinar nesta cópia a identidade do nucleotídeo em um ou mais dos sítios polimórficos nesta cópia para designar um haplótipo do CNTF ao indivíduo. O ácido nucléico pode ser isolado usando qualquer método capaz de separar as duas cópias do gene do CNTF ou fragmento, incluindo mas não limitados a ele, um dos métodos descritos acima para se preparar os isogêneses do CNTF, com clonagem direcionada *in vivo* sendo o caminho preferido.

Como será facilmente observado por aqueles versados na técnica, qualquer clone individual somente fornecerá a informação do haplótipo em uma das duas cópias do gene do CNTF presente em um indivíduo. Se informação do haplótipo for desejada para a cópia de outros indivíduos, clones do CNTF adicionais necessitarão ser examinados. Tipicamente, pelo menos cinco clones devem ser examinados para se ter mais do que uma probabilidade de 90 % de haplotipação de ambas as cópias do gene do CNTF em um indivíduo. Em uma modalidade particularmente preferida, o nucleotídeo em cada um dos sítios polimórficos é identificado.

Em uma modalidade preferida, um par de haplótipos do CNTF é determinado para um indivíduo para identificação da sequência de fase dos nucleotídeos em um ou mais dos sítios polimórficos em cada cópia do gene

do CNTF que está presente no indivíduo. Em uma modalidade particularmente preferida, o método de haplotipação compreende a identificação da seqüência de fase dos nucleotídeos em cada sítio polimórfico em cada cópia do gene do CNTF. Quando haplotipar ambas as cópias do gene, a etapa de
5 identificação é preferivelmente executada com cada cópia do gene sendo colocado em recipientes separados. No entanto, é também visionado que se as duas cópias forem rotuladas com rótulos diferentes, ou forem de outra maneira separadamente distinguíveis ou identificáveis, pode ser possível em alguns casos executar o método no mesmo recipiente. Por exemplo, se as
10 primeira e segunda cópias do gene forem rotulados com primeira e segunda tinturas fluorescentes diferentes, respectivamente, e um oligonucleotídeo específico do alelo rotulado com ainda uma terceira tintura fluorescente diferente for usado para analisar o(s) sítio(s) polimórfico(s), então detectar uma combinação das primeira e terceira tinturas deve identificar o polimorfismo
15 na primeira cópia do gene enquanto detectar uma combinação das segunda e terceira tinturas deve identificar o polimorfismo na segunda cópia do gene.

Em ambos métodos de genotipação e haplotipação, a identidade de um nucleotídeo (ou par de nucleotídeo) em um sítio polimórfico pode ser determinada mediante a amplificação de uma região alvo contendo o(s)
20 sítio(s) polimórfico(s) diretamente de uma ou ambas as cópias do gene do CNTF, ou fragmento deste, e a seqüência da(s) região(ões) amplificada(s) determinada por métodos convencionais. Será facilmente observado pelo versado que apenas um nucleotídeo será detectado em um sítio polimórfico nos indivíduos que são homozigotos neste sítio, enquanto dois nucleotídeos
25 diferentes serão detectados se o indivíduo for heterozigoto com relação a este sítio. O polimorfismo pode ser identificado diretamente, conhecido como identificação tipo positiva, ou por inferência, referido como identificação tipo negativa. Por exemplo, onde um SNP for conhecido ser guanina e citosina em uma população de referência, um sítio pode ser positivamente
30 determinado para ser ou guanina ou citosina para todos os indivíduos homozigotos neste sítio, ou tanto guanina quanto citosina, se o indivíduo for heterozigoto neste sítio. Alternativamente, o sítio pode ser negativamente

determinado não ser guanina (e assim citosina/citosina) ou não citosina (e assim guanina/guanina).

Além disso, a identidade do(s) alelo(s) presente(s) em qualquer um dos novos sítios polimórficos aqui descritos pode ser indiretamente determinada mediante a genotipação de um sítio polimórfico não apresentado aqui que está em desequilíbrio de ligação com o sítio polimórfico que é de interesse. Dois sítios são ditos estarem em desequilíbrio de ligação se a presença de uma variante particular e um sítio intensifica a capacidade de prognosticar uma outra variante no segundo sítio (ver, Stevens, JC 1999, *Mol Diag* 4: 309-317). Os sítios polimórficos em desequilíbrio de ligação com os sítios polimórficos agora apresentados podem ser localizados nas regiões do gene ou em outras regiões genômicas não examinadas aqui. A genotipação de um sítio polimórfico em desequilíbrio de ligação com os novos sítios polimórficos aqui descritos pode ser executada por, mas não é limitado a ele, qualquer um dos métodos acima mencionados para se detectar a identidade do alelo em um sítio polimórfico.

A(s) região(ões) alvo(s) pode(m) ser amplificada(s) usando qualquer método de amplificação dirigido ao oligonucleotídeo, incluindo, mas não limitado à reação da cadeia de polimerase (PCR) (Patente U.S. número 4.965.188), reação da cadeia de ligase (LCR) (Barany et al., Proc. Natl Acad Sci USA 88 :189-193, 1991; WO 90/01069), e análise de ligação do oligonucleotídeo (OLA) (Landegren et al., Science 241: 1077-1080, 1988). Os oligonucleotídeos úteis como iniciadores ou sondas em tais métodos devem especificamente hibridizar uma região do ácido nucléico que contém ou é adjacente ao sítio polimórfico. Tipicamente, os oligonucleotídeos são entre 10 e 35 nucleotídeos no comprimento e preferivelmente, entre 15 e 30 nucleotídeos no comprimento. Mais preferivelmente, os nucleotídeos são de 20 a 25 nucleotídeos de extensão. O comprimento exato do oligonucleotídeo dependerá de muitos fatores que são rotineiramente considerados e praticados pelo versado.

Outros procedimentos conhecidos de amplificação do ácido nucléico podem ser usados para amplificar a região alvo incluindo sistemas de

amplificação com base na transcrição (Patente U.S. número 5.130.238; EP 329.822; Patente U.S. número 5.169.766, WO 89/06700) e métodos isotérmicos (Walker et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 392-396, 1992).

Um polimorfismo na região alvo pode também ser avaliado antes ou após a amplificação usando um dos vários métodos com base na hibridização conhecidos na técnica. Tipicamente, os oligonucleotídeos específicos do alelo são utilizados na execução de tais métodos. Os oligonucleotídeos específicos do alelo podem ser usados como pares de sonda diferentemente rotulados, com um membro do par apresentando uma aliança perfeita com uma variante de uma seqüência alvo e o outro membro apresentando uma aliança perfeita com uma variante diferente. Em algumas modalidades, mais do que um sítio polimórfico pode ser detectado imediatamente usando uma série de oligonucleotídeos específicos do alelo ou pares de oligonucleotídeo. Preferivelmente, os membros da série possuem temperaturas de fusão dentro de 5 °C e mais preferivelmente dentro de 2 °C entre si quando se hibridiza cada um dos sítios polimórficos sendo detectados.

A hibridização de um oligonucleotídeo específico do alelo para um polinucleotídeo alvo pode ser executada com ambas entidades em solução ou tal hibridização pode ser executada quando o oligonucleotídeo ou o polinucleotídeo alvo for covalente ou não covalentemente afixado em um suporte sólido. A fixação pode ser mediada, por exemplo, por interações de anticorpo-antígeno, poli-L-Lys, estreptavidina ou avidina-biotina, pontes de sal, interações hidrofóbicas, ligações químicas, cozimento de reticulação UV, etc. Os oligonucleotídeos específicos do alelo podem ser sintetizados diretamente no suporte sólido ou ligados ao suporte sólido subsequente à síntese. Os suportes sólidos adequados para uso nos métodos de detecção da invenção incluem substratos produzidos de silício, vidro, plástico, papel e outros mais, que podem ser formados, por exemplo, em reservatórios (como nas placas de 96 reservatórios), lâminas, folhas, membranas, fibras, lascas, pratos, e contas. O suporte sólido pode ser tratado, revestido ou derivatizado para facilitar a imobilização do oligonucleotídeo específico do alelo ou

ácido nucléico alvo.

O genótipo ou haplótipo para o gene do CNTF de um indivíduo pode também ser determinado pela hibridização de uma amostra nucléica contendo uma ou ambas as cópias do gene para as disposições e subdisposições de ácido nucléico tais como descritos no WO 95/11995. As disposições devem conter uma bateria de oligonucleotídeos específicos do alelo representando cada um dos sítios polimórficos a serem incluídos no genótipo ou haplótipo.

A identidade dos polimorfismos pode também ser determinada usando uma técnica de detecção mal combinada incluindo mas não limitada ao método de proteção RNase usando ribossondas (Winter et al., Proc Natl Acad Sci USA 82:7575, 1985; Meyers et al., Science 230:1242, 1985) e proteínas que reconhecem as más combinações de nucleotídeo, tais como a proteína *E. coli* mutS (Modrich P. Ann Rev Genet 25:229-253, 1991). Alternativamente, os alelos variantes podem ser identificados por análise de polimorfismo da conformação de filamento único (SSCP) (Orita et al., Genomics 5: 874-879, 1989; Humphries et al., em Molecular Diagnosis of Genetic Diseases, R. Elles, ed., pp. 321-340, 1996) ou eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) (Wartell et al., Nucl Acids Res 18:2699-2706, 1990; Sheffield et al., Proc Natl Acad Sci USA 86: 232-236, 1989).

Um método de extensão do iniciador mediada por polimerase pode também ser usado para identificar o(s) polimorfismo(s). Vários de tais métodos foram descritos na literatura de patente e científica e incluem o método "Genetic Bit Analysis" (WO 92/15712) e a análise de bit genético mediada por ligase / polimerase (Patente U.S. número 5.679.524). Os métodos relatados são apresentados nas WO 91/02087, WO 90/09455, WO 95/17676, Patente U.S. números 5.302.509 e 5.945.283. Os iniciadores prolongados contendo um polimorfismo podem ser detectados por espectrometria de massa como descrito na Patente U.S. número 5.605.798. Outro método de extensão do iniciador é a PCR específica do alelo (Ruafio et al., Nucl Acids Res 17:8392, 1989; Ruafio et al., Nucl Acids Res 19, 6877-6882, 1991; WO 93/22456; Turki et al., J Clin Invest 95: 1635-1641, 1995). Além

disso, múltiplos sítios polimórficos podem ser investigados por simultaneamente amplificar as múltiplas regiões do ácido nucléico usando séries de iniciadores específicos do alelo como descrito em Wallace et al. (WO 89/10414).

5 Em uma modalidade preferida, os dados de freqüência do haplótipo para cada grupo etnogeográfico são examinados para determinar se são consistentes com o equilíbrio Hardy-Weinberg. O equilíbrio Hardy-Weinberg (D.L. Hartl et al., Principles of Population Genomics, Sinauer Associates (Sunderland, MA), 3ª ed., 1997) postula que a freqüência de encontrar o par de haplótipo 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 estatisticamente significativa entre as freqüências de haplótipo observadas e esperadas podem ser devido a um ou mais fatores incluindo a procriação consanguínea significativa no grupo da população, pressão seletiva forte sobre o gene, 15 tendência de amostragem e/ou erros no processo de genotipação. Se grandes desvios de equilíbrio Hardy-Weinberg forem observados em um grupo etnogeográfico, o número de indivíduos neste grupo pode ser aumentado para se observar se o desvio é devido a uma tendência de amostragem. Se um tamanho de amostra maior não reduzir a diferença entre as freqüências de par de haplótipo esperadas, então pode-se querer considerar a haplotipação do indivíduo usando um método de haplotipação direta tal como, por exemplo, tecnologia de CLASPER System® (Patente U.S. número 5.866.404), 20 ou PCR de faixa longa específica do alelo (Michalotos-Beloin et al., Nucl Acids Res 24:4841-4843, 1996).

25 Em uma modalidade deste método para prognosticar um par de haplótipo do CNTF, a etapa de designação envolve a execução da seguinte análise. Primeiro, cada um dos pares de haplótipo possíveis é comparado aos pares de haplótipo na população de referência. Geralmente, apenas um dos pares de haplótipo na população de referência se iguala a um par de haplótipo possível e este par é designado ao indivíduo. Ocasionalmente, 30 somente um haplótipo representado nos pares de haplótipo de referência é consistente com um par de haplótipo possível para um indivíduo, e em tais

casos o indivíduo é designado a um par de haplótipo contendo este haplótipo conhecido e um novo haplótipo derivado pela subtração do haplótipo conhecido do par de haplótipo possível. Em raros casos, ou nenhum haplótipo na população de referência é consistente com os pares de haplótipo possíveis, ou alternativamente, múltiplos pares de haplótipo de referência são consistentes com os pares de haplótipo possíveis. Em tais casos, o indivíduo é preferivelmente haplotipado usando um método de haplotipação molecular direto tal como, por exemplo, tecnologia CLASPER System® (Patente U.S. número 5.866.404), ou PCR de faixa longa específica do alelo (Michalotos-Beloin et al., Nucl Acids Res 24:4841-4843, 1996).

A invenção também fornece um método para determinar a frequência de um genótipo de CNTF ou um haplótipo de CNTF em uma população. O método compreende determinar o genótipo ou o par de haplótipo para o gene de CNTF que está presente em cada membro da população, em que o genótipo ou haplótipo compreendem o par de nucleotídeos ou o nucleotídeo detectado em um ou mais dos sítios polimórficos no gene de CNTF, incluindo mas não limitando o polimorfismo de FS63 TER; e calcular a frequência em que qualquer genótipo ou haplótipo particular é encontrado na população. A população pode ser uma população de referência, uma população de família, uma população do mesmo sexo, um grupo da população, uma população de traços (por exemplo, um grupo de indivíduos que apresentem um traço de interesse, tal como uma condição médica ou resposta a um tratamento terapêutico).

Em outro aspecto da invenção, os dados de frequência para os genótipos e/ou haplótipos do CNTF encontrados em uma população de referência são usados em um método para identificar uma associação entre um traço e um genótipo do CNTF ou um haplótipo do CNTF. O traço pode ser qualquer fenótipo detectável, incluindo, porém sem limitar, a suscetibilidade a uma doença ou resposta a um tratamento. O método envolve obter dados sobre a frequência do(s) genótipo(s) ou haplótipo(s) de interesse em uma população de referência, bem como em uma população que apresente o traço. Os dados da frequência quanto a uma ou a ambas dentre as popula-

ções de referência e de traço podem ser obtidos por genotipagem ou haplotipagem de cada indivíduo nas populações, com o uso de um dos métodos descritos acima. Os haplótipos para a população de traço podem ser determinados diretamente ou, alternativamente, pelo genótipo previsto para a
5 abordagem do haplótipo descrita acima.

Em outra modalidade, os dados da frequência para as populações de referência e/ou de traço são obtidos acessando-se previamente determinados dados de frequência, os quais podem estar na forma escrita ou eletrônica. Por exemplo, os dados de frequências podem estar presentes
10 em um banco de dados que seja acessível por um computador. Uma vez que os dados de frequência sejam obtidos, as frequências do(s) genótipo(s) ou do(s) haplótipo(s) de interesse nas populações de referência e de traço são comparadas. Em uma modalidade preferida, as frequências de todos os genótipos e/ou haplótipos observadas nas populações são comparadas. Se
15 um genótipo ou haplótipo particular para o gene do CNTF for mais freqüente na população de traço do que na população de referência em uma quantidade estatisticamente significativa, então o traço é prognosticado estar associado com aquele genótipo ou haplótipo do CNTF.

Em uma modalidade preferida, a análise estatística é realizada
20 mediante o uso de análise padrão de testes de variação (ANOVA) com um método de correção de Bonferroni e/ou um de comando de entrada que simula a correlação de genótipo fenótipo muitas vezes e calcula um valor de importância. Quando muitos polimorfismos estiverem sendo analisados, uma correção do fator pode ser realizada para corrigir uma associação significativa que possa ser observada mediante mudança. Quanto a métodos estatísticos para uso nos métodos desta invenção, ver: Statistical Methods in Bio-
25 logy, 3ª edição, Bailey NTJ, Cambridge Univ. Press (1997); Introduction to Computational Biology, Waterman MS, CRC Press (2000), e Bioinformatics, Baxevanis AD e Ouellette BFF editores (2001) John Wiley & Sons, Inc.

30 Em uma modalidade preferida do método, o traço de interesse é uma resposta clínica apresentada por um paciente a algum tratamento terapêutico, por exemplo a resposta a uma droga alvejando o CNTF ou resposta

a um tratamento terapêutico quanto a uma condição médica.

Em outra modalidade da invenção, um genótipo ou haplótipo detectável que esteja em desequilíbrio de articulação com o genótipo ou o haplótipo do CNTF de interesse pode ser usado como um marcador substituto. Um genótipo que está em desequilíbrio de artivulação com um genótipo CNTF pode ser descoberto determinando-se se um genótipo ou haplótipo particular para o gene do CNTF é mais freqüente na população que também demonstra o genótipo potencial marcador substituto, do que na população de referência em uma quantidade estatisticamente significativa, depois o genótipo marcador é prognosticado como estando associado com aquele genótipo ou haplótipo do CNTF e, então, pode ser usado como um marcador substituto no lugar do genótipo do CNTF.

Como aqui usado, "condição médica" inclui, sem limitação, qualquer condição ou doença manifestada como um ou mais sintomas físicos e/ou psicológico para o qual o tratamento é desejável, e inclui doenças e outros distúrbios previamente e recém-identificados.

Como aqui usada, a expressão "resposta clínica" significa qualquer uma ou todas das seguintes: uma medida quantitativa da resposta, nenhuma resposta e resposta adversa (isto é, efeitos colaterais).

De modo a deduzir uma correlação entre a resposta clínica a um tratamento e um genótipo ou haplótipo do CNTF, é necessário obter dados sobre as respostas clínicas apresentadas por uma população de indivíduos que tenham recebido o tratamento, daqui por diante a "população clínica". Estes dados clínicos podem ser obtidos pela análise dos resultados de um exame clínico que já tenha sido desenvolvido e/ou os dados clínicos podem ser obtidos pela designação e realização de um ou mais novos exames clínicos.

Como aqui usada, a expressão "exame clínico" significa qualquer estudo de pesquisa projetado para coletar dados clínicos sobre as respostas a um tratamento particular, e inclui, sem limitação, os exames clínicos de fase I, fase II e fase III. Métodos padrão são usados para definir a população de pacientes e para registrar os indivíduos.

É preferível que os indivíduos incluídos na população clínica tenham sido classificados quanto à existência da condição médica de interesse. Isto é importante nos casos em que o(s) sintoma(s) que esteja(m) sendo apresentado(s) pelos pacientes possa(m) ser causados por mais do
 5 que uma condição subjacente, e em que o tratamento das condições subjacentes não sejam os mesmos. Um exemplo disto deve ser quando os pacientes experimentam dificuldades de respiração que sejam devido ou a asma ou a infecções respiratórias. Se ambos os grupos forem tratados com uma medicação para a asma, deve haver um grupo espúrio de não respondedores
 10 aparentes que realmente não tinham asma. Estas pessoas devem afetar a capacidade para detectar qualquer correlação entre o haplótipo e o resultado do tratamento. Esta classificação dos pacientes potenciais deve empregar um exame físico padrão ou um ou mais testes de laboratório. Alternativamente, a classificação dos pacientes deve usar a haplotipagem para
 15 situações em que exista uma forte correlação entre o par de haplótipos e a suscetibilidade ou gravidade da doença.

O tratamento terapêutico de interesse é administrado a cada paciente na população de exame e cada resposta do paciente ao tratamento é medida com o uso de um ou mais critérios predeterminados. Considera-
 20 se, em muitos casos, que a população de exame apresente uma faixa de respostas e que o pesquisador escolha o número de grupos de respondedores (por exemplo, baixo, médio, alto) compostos pelas várias respostas. Além disso, o gene do CNTF para cada paciente na população de exame é genotipado e/ou haplotipado, o que pode ser feito antes ou após a adminis-
 25 tração do tratamento.

Após os dados tanto clínicos quanto de polimorfismo terem sido obtidos, as correlações entre as respostas individuais e o conteúdo do genótipo ou haplótipo do CNTF são produzidas. As correlações podem ser produzidas de várias maneiras. Em um método, os pacientes são agrupados
 30 por seu genótipo ou haplótipo do CNTF (ou par de haplótipos) (também referidos como um grupo de polimorfismo), e depois as médias e os desvios padrão das respostas clínicas apresentada pelos membros de cada grupo de

polimorfismo, são calculados.

Estes resultados são então analisados para que se determine se qualquer variação observada na resposta clínica entre os grupos de polimorfismo é estatisticamente significativa. Os métodos de análise estatística que podem ser usados são descritos em L. D. Fisher e G. vanBelle, "Biostatistics: A Methodology for the Health Sciences", Wiley-Interscience (New York) 1993. Esta análise também pode incluir um cálculo de regressão cujos sítios polimórficos no gene do CNTF dão a contribuição mais significativa às diferenças no fenótipo. Um modelo de regressão útil na invenção é descrito no Pedido PCT intitulado "Methods for Obtaining and Using Haplotype Data", depositado em 26 de junho de 2000.

Um segundo método para encontrar correlações entre o conteúdo do haplótipo do CNTF e as respostas clínicas, usa modelos prognósticos com base nos algoritmos de otimização da minimização de erro. Um dos muitos algoritmos de otimização é um algoritmo genético (R. Judson, "Genetic Algorithms and Their Uses in Chemistry" em *Reviews in Computational Chemistry*, Vol. 10, pp. 1 a 73, K. B. Lipkowitz e D. B. Boyd, eds. (VCH Publishers, New York, 1997). O recozimento simulado (Press *et al.*, "Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing", Cambridge University Press (Cambridge) 1992, Capítulo 10), redes neurais (E. Rich e K. Knight, "Artificial Intelligence", 2ª Edição (McGraw-Hill, New York, 1991, Capítulo 18), métodos de descida de gradiente padrão (Press *et al.*, *supra*, Capítulo 10), ou outras abordagens de otimização global ou local (ver exame em Judson, acima) podem também ser usados. Preferivelmente, a correlação é observada usando-se uma abordagem de algoritmo genético conforme descrito no Pedido PCT intitulado "Methods for Obtaining and Using Haplotype Data", depositado em 26 de junho de 2000.

As correlações também podem ser analisadas com o uso de técnicas ANOVA para determinar quanto da variação nos dados clínicos é explanado por diferentes subconjuntos dos sítios polimórficos no gene do CNTF. Como descrito no Pedido PCT intitulado "Methods for Obtaining and Using Haplotype Data", depositado em 26 de junho de 2000, ANOVA é usa-

do para testar hipóteses sobre se uma resposta variável é causada ou correlacionada por um ou mais traços ou variáveis que possam ser medidos (Fisher and vanBelle, acima, Capítulo 10).

5 Das análises descritas acima, um modelo matemático pode ser facilmente construído pelo técnico versado, que prediga a resposta clínica como uma função do conteúdo do genótipo ou haplótipo do CNTF. Preferivelmente, o modelo é validado em um ou mais exames clínicos de acompanhamento projetados para testar o modelo.

10 A identificação de uma associação entre uma resposta clínica e um genótipo ou haplótipo (ou par de haplótipo) para o gene do CNTF, pode ser a base para projetar um método de diagnóstico para determinar aqueles pacientes que responderão ou não ao tratamento, ou, alternativamente, responderão em um menor nível e, assim, poderão requerer mais tratamento, isto é, maior dose de uma droga. O método de diagnóstico pode ter uma
15 dentre várias formas: por exemplo, um teste direto de DNA (isto é, genotipar ou haplotipar um ou mais dos sítios polimórficos no gene do CNTF), um teste sorológico, ou uma medição de exame físico. A única exigência é que exista uma boa correlação entre os resultados do teste de diagnóstico e o genótipo ou haplótipo do CNTF subjacentes, os quais sejam, por sua vez,
20 correlacionados com a resposta clínica. Em uma modalidade preferida, este método de diagnóstico usa o método de prognóstico de haplotipagem descrito acima.

Um computador pode implementar qualquer ou todas as operações analíticas ou matemáticas envolvidas na prática dos métodos da presente invenção. Além disso, o computador pode executar um programa que
25 proporcione observação (ou telas) apresentadas sobre um dispositivo de exibição e com o qual o usuário possa interagir para observar e analisar grandes quantidades de informações que se relacionem com o gene do CNTF e sua variação genômica, incluindo a localização cromossômica, a estrutura do gene e a família do gene, os dados de expressão do gene, os
30 dados do polimorfismo, os dados da seqüência genética, e os dados da população de dados clínicos (por exemplo, dados sobre a origem etnogeográfica).

fica, respostas clínicas, genótipos e haplótipos para uma ou mais populações). Os dados do polimorfismo do CNTF aqui descritos podem ser armazenados como parte de um banco de dados relacional (por exemplo, um caso de um banco de dados Oracle ou um conjunto de arquivos simples ASCII). Estes dados de polimorfismo podem ser armazenados na unidade de disco rígido do computador ou pode, por exemplo, ser armazenado em um CD-ROM ou em um ou mais outros dispositivos de armazenagem acessíveis pelo computador. Por exemplo, os dados podem ser armazenados em um ou mais bancos de dados em comunicação com o computador através de uma rede.

Em outras modalidades, a invenção fornece métodos, composições e kits para haplotipar e/ou genotipar o gene do CNTF em um paciente. Os métodos envolvem identificar o nucleotídeo ou par de nucleotídeos presente no nucleotídeo: 103 G >A no GenBank, número de acesso X55890 (Versão 1). Esta substituição de nucleotídeos resulta na produção de um novo sítio acceptor de encaixe e uma proteína aberrante resultante. Ver PubMed ID # 9285965.

As composições contêm sondas de oligonucleotídeos e iniciadores projetados para especificamente hibridizar a uma ou mais regiões alvo contendo, ou que sejam adjacentes a, um sítio polimórfico. Os métodos e composições para estabelecer o genótipo ou haplótipo de um paciente nos novos sítios polimórficos aqui descritos são úteis para se estudar o efeito do polimorfismo na etiologia de doenças afetadas pela expressão e função da proteína do CNTF ou de sua falta, estudando-se a eficácia das drogas que alvejam o CNTF, prevendo-se a suscetibilidade individual às doenças afetadas pela expressão e função da proteína do CNTF e a resposta às drogas que alvejam o CNTF.

Em outra modalidade ainda, a invenção fornece um método para identificar uma associação entre um genótipo ou haplótipo e um traço. Nas modalidades preferidas, o traço é a suscetibilidade a uma doença, a severidade de uma doença, o estadiamento de uma doença ou a resposta a uma droga. Tais métodos têm aplicabilidade no desenvolvimento de testes de

diagnósticos e tratamentos terapêuticos para todas as aplicações farmacogenéticas em que exista o potencial para uma associação entre um genótipo e um resultado de tratamento que inclua as medições da eficácia, as medições farmacocinéticas (PK) e as medições dos efeitos colaterais.

5 A presente invenção também fornece um sistema de computador para armazenar e apresentar dados de polimorfismo determinados para o gene do CNTF. O sistema de computador compreende uma unidade de processamento de computador; um vídeo; e um banco de dados contendo os dados do polimorfismo. Os dados do polimorfismo incluem os polimorfismos, os genótipos e os haplótipos identificados para o gene do CNTF em
10 uma população de referência. Em uma modalidade preferida, o sistema de computador é capaz de produzir um vídeo mostrando os haplótipos do CNTF organizados de acordo com seus relacionamentos evolucionários.

 Em outro aspecto, a invenção fornece sondas de SNP, as quais
15 são úteis em classificar pessoas de acordo com seus tipos de variação genética. As sondas de SNP de acordo com a invenção são oligonucleotídeos que podem discriminar entre alelos de um ácido nucléico de SNP em ensaios convencionais de discriminação alélica.

 Como aqui usado, um "ácido nucléico de SNP" é uma seqüência
20 de ácido nucléico que compreende um nucleotídeo que é variável dentro de uma seqüência de nucleotídeo de outra forma idêntica entre indivíduos ou grupos de indivíduos, assim existindo como alelos. Tais ácidos nucléicos de SNP são preferivelmente de cerca de 15 a cerca de 500 nucleotídeos de comprimento. Os ácidos nucléicos de SNP podem constituir parte de um cromossoma, ou eles podem ser uma cópia exata de uma parte de um cromossoma, por exemplo por amplificação de uma tal parte de um cromossoma através de PCR ou através de clonagem. Os ácidos nucléicos de SNP
25 são referidos daqui por diante simplesmente como "SNPs". As sondas de SNP em conformidade com a invenção são oligonucleotídeos que são complementares a um ácido nucléico de SNP.
30

 Como aqui usado, o termo "complementar" significa exatamente complementar na totalidade do comprimento do oligonucleotídeo no sentido

da palavra de Watson e Crick.

Em certas modalidades preferidas, os oligonucleotídeos em conformidade com este aspecto da invenção são complementares a um alelo do ácido nucléico de SNP, mas não a qualquer outro alelo do ácido nucléico de SNP. Os oligonucleotídeos de acordo com esta modalidade da invenção pode discriminar entre os alelos do ácido nucléico de SNP de várias maneiras. Por exemplo, sob condições de hibridização severas, um oligonucleotídeo de comprimento apropriado hibridizará a um alelo do ácido nucléico de SNP, mas não a qualquer outro alelo do ácido nucléico de SNP. O oligonucleotídeo pode ser rotulado por um radiorrótulo ou um rótulo fluorescente. Alternativamente um oligonucleotídeo de comprimento apropriado pode ser usado como um iniciador para a PCR, em que o nucleotídeo de terminal 3' seja complementar a um alelo do ácido nucléico de SNP, mas não a qualquer outro alelo. Nesta modalidade, a presença ou ausência de amplificação por PCR determina o haplótipo do ácido nucléico de SNP.

Assim, em uma modalidade, a invenção fornece um polinucleotídeo isolado compreendendo uma seqüência de nucleotídeo que seja uma variante polimórfica de uma seqüência de referência para o gene do CNTF ou um seu fragmento. A seqüência de referência compreende o nº de acesso X55890 (Versão 1) do GenBank e a variante polimórfica compreende pelo menos um polimorfismo, incluindo, mas sem limitação, o nucleotídeo: 103 G>A. Uma variante polimórfica particularmente preferida é um isoforma de ocorrência natural (também referido aqui como um "isógeno") do gene do CNTF.

Os fragmentos genômicos e de cDNA da invenção compreendem pelo menos um novo sítio polimórfico identificado neste relatório e têm um comprimento de pelo menos 10 nucleotídeos e podem variar até o comprimento completo do gene. Preferivelmente, um fragmento de acordo com a presente invenção situa-se entre 100 e 3000 nucleotídeos de comprimento, e mais preferível entre 200 e 2000 nucleotídeos de comprimento, e o mais preferível entre 500 e 1000 nucleotídeos de comprimento.

Na descrição dos sítios polimórficos aqui identificados, referên-

cia é feita ao filamento de sentido do gene, por conveniência. No entanto, como reconhecido pelo técnico versado, as moléculas de ácido nucléico que contêm o gene do CNTF podem ser moléculas complementares de duplo filamento e, assim, a referência a um sítio particular no filamento de sentido
5 se refere também ao sítio correspondente no filamento antisentido complementar. Assim, referência pode ser feita ao mesmo sítio polimórfico em qualquer filamento, e um oligonucleotídeo pode ser designado para hibridizar especificamente a qualquer filamento em uma região alvo contendo o sítio polimórfico. Assim, a invenção também inclui polinucleotídeos de fila-
10 mento único que sejam complementares ao filamento de sentido das variantes genômicas do CNTF aqui descritas.

O(s) efeito(s) dos polimorfismos aqui identificados na expressão do CNTF pode(m) ser pesquisados mediante preparo de células e/ou organismos recombinantes, preferivelmente animais recombinantes, contendo
15 uma variante polimórfica do gene do CNTF. Como aqui usado, "expressão" inclui, sem limitação, um ou mais do seguinte: transcrição do gene no mRNA precursor; encaixe e outro processamento do mRNA precursor para produzir mRNA maduro; estabilidade do mRNA; tradução do mRNA maduro na proteína do CNTF (incluindo a utilização do códon e a disponibilidade do tRNA);
20 e glicosilação e/ou outras modificações do produto de tradução, se necessário para a expressão e função apropriadas.

Para preparar uma célula recombinante da invenção, o isógeno desejado do CNTF pode ser introduzido na célula em um vetor, de tal modo que o isógeno permanece extracromossômico. Em uma tal situação, o gene
25 será expresso pela célula a partir da localização extracromossômica. Em uma modalidade preferida, o isógeno do CNTF é introduzido em uma célula de uma maneira tal que ele se recombine com o gene endógeno do CNTF presente na célula. Essa recombinação requer a ocorrência de um evento de recombinação dupla, dessa forma resultando no polimorfismo desejado
30 do gene do CNTF. Vetores para a introdução de genes, tanto para recombinação quanto para manutenção extracromossômica, são conhecidos na técnica, e qualquer vetor ou construção de vetor adequados pode ser usado

na invenção. Métodos tais como a eletroporação, o bombardeamento de partículas, a coprecipitação de fosfato de cálcio e a transdução viral para introduzir DNA nas células, são conhecidos na técnica; portanto, a escolha do método pode depender da competência e preferência do clínico versado.

5 Exemplos de células em que o isógeno do CNTF pode ser introduzido incluem, sem que a estas fiquem limitadas, as células de cultura contínua, tais como COS, NIH/3T3, e as células primárias ou de cultura do tipo de tecido relevante, isto é, elas expressam o isógeno do CNTF. Tais células recombinantes podem ser usadas para comparar as atividades bio-
10 lógicas das diferentes variantes de proteínas.

Os organismos recombinantes, isto é, os animais transgênicos, que expressem um gene variante, são preparados com o uso de procedimentos padrão conhecidos na técnica. De preferência, uma construção que compreenda o gene variante é introduzida em um animal não-humano ou
15 um ascendente do animal em um estágio embrionário, isto é, o estágio de uma célula, ou geralmente não mais tarde do que cerca do estágio de oito células. Os animais transgênicos que carregam as construções da invenção podem ser produzidos por vários métodos conhecidos daqueles que versados na técnica. Um método envolve transfectar no embrião um retrovírus
20 construído para conter um ou mais elementos isoladores, um gene ou genes de interesse, e outros componentes conhecidos daqueles versados na técnica para fornecer um vetor de transporte completo abrigando o(s) gene(s) isolado(s) como um transgene; ver, por exemplo, a Patente U.S. nº 5.610.053. Outro método envolve injetar diretamente um transgene no em-
25 brião. Um terceiro método envolve o uso de células tronco embrionárias.

Exemplos de animais, em que os isógenos do CNTF podem ser introduzidos, incluem, sem limitação, os camundongos, ratos, outros roedores, e primatas não-humanos (ver "The Introduction of Foreign Genes into Mice" e as referências nele citadas, em: Recombinant DNA, Eds. J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski e M. Zoller. W. H. Freeman and Company,
30 New York, páginas 254-272). Os animais transgênicos que estavelmente expressam um isógeno do CNTF humano e produzem a proteína do CNTF

humano podem ser usados como modelos biológicos para estudar doenças relacionadas à expressão e/ou atividade do CNTF anormal, e para examinar e ensaiar várias drogas candidatas, compostos e regimes de tratamento para reduzir os sintomas ou efeitos destas doenças.

5 Será entendido pelo leitor versado que a maior parte ou todos os compostos usados na presente invenção são capazes de formar sais, e que as formas de sal dos produtos farmacêuticos são comumente usadas, frequentemente porque elas são mais facilmente cristalizadas e purificadas do que o são as bases livres. Em todos os casos, o uso dos produtos farmacêuticos descritos acima como sais é considerado no presente relatório des-
10 critivo e, frequentemente, é preferido, e os sais farmaceuticamente aceitáveis de todos os compostos são incluídos nos nomes deles.

 Muitos dos compostos usados nesta invenção são aminas e, conseqüentemente, reagem com qualquer dentre vários ácidos inorgânicos e orgânicos para formar sais de adição ácidos farmaceuticamente aceitáveis. Uma vez que algumas das aminas livres dos compostos desta inven-
15 ção são tipicamente óleos em temperatura ambiente, é preferível transformar as aminas livres em seus sais de adição ácidos farmaceuticamente aceitáveis para facilidade de manipulação e administração, tendo em vista
20 que estes últimos são rotineiramente sólidos em temperatura ambiente. Os ácidos comumente empregados para formar tais sais são ácidos inorgânicos tais como o ácido clorídrico, o ácido bromídrico, o ácido iodídrico, o ácido sulfúrico, o ácido fosfórico, e outros, e ácidos orgânicos tais como o ácido p-toluenossulfônico, o ácido metanossulfônico, o ácido oxálico, o ácido p-bromofenilsulfônico, o ácido carbônico, o ácido succínico, o ácido cítrico, o
25 ácido benzóico, o ácido acético e outros.

 Exemplos de tais sais farmaceuticamente aceitáveis, assim, são o sulfato, pirofosfato, bissulfato, sulfito, bissulfito, fosfato, monoidrogenfosfato, diidrogenfosfato, metafosfato, pirofosfato, cloreto, brometo, iodeto,
30 acetato, propionato, decanoato, caprilato, acrilato, formiato, isobutirato, caproato, heptanoato, propiolato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, maleato, butina-1,4-dioato, hexina-1,6-dioato, benzoato,

clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, ftalato, sulfonato, xilenossulfonato, fenilacetato, fenilpropionato, fenilbutirato, citrato, lactato, beta-hidroxibutirato, glicolato, tartarato, metanosulfonato, propanossulfonato, naftaleno-1-sulfonato, naftaleno-2-sulfonato, mandelato e outros. Sais farmaceuticamente aceitáveis preferidos são aqueles formados com o ácido clorídrico, o ácido oxálico ou o ácido fumárico.

Administração

As dosagens das drogas usadas na presente invenção devem, na análise final, ser estabelecidas pelo médico encarregado do caso, com o uso do conhecimento das drogas, das propriedades das drogas em combinação como determinado em experiências clínicas, e das características do paciente, incluindo doenças outras que não aquela para a qual o médico está tratando o paciente. As diretrizes gerais das dosagens, e de algumas dosagens preferidas, podem e serão fornecidas aqui, para exemplo; loperidona: de 1 a 50 mg uma vez por dia e o mais preferível de 12 a 16 mg uma vez por dia; Olanzapina: de cerca de 0,25 a 50 mg, uma vez/dia; preferível de 1 a 30 mg, uma vez/dia; e o mais preferível de 1 a 25 mg uma vez/dia; Clozapina: de cerca de 12,5 a 900 mg diariamente; preferível de cerca de 150 a 450 mg diariamente; Risperidona: de cerca de 0,25 a 16 mg diariamente; preferível de cerca de 2 a 8 mg diariamente; Sertindol: de cerca de 0,0001 a 1,0 mg/kg diariamente; Quetiapina: de cerca de 1,0 a 40 mg/kg dados uma vez diariamente ou em doses divididas; Ziprasidona: de cerca de 5 a 500 mg diariamente; preferível de cerca de 50 a 100 mg diariamente; Haldol: de 0,5 a 40 mg uma vez por dia.

Todos os compostos envolvidos são oralmente viáveis e são normalmente administrados por via oral, e assim a administração oral da combinação adjuntiva é preferida. Eles podem ser administrados juntos, em uma forma de dosagem única, ou podem ser administrados separadamente. No entanto, a administração oral não é a única via ou mesmo a única via preferida. Por exemplo, a administração transdérmica pode ser muito desejável para pacientes que sejam suscetíveis de esquecimento ou petulantes

acerca de tomar remédio oral. Uma das drogas pode ser administrado por uma via, tal como a oral, e os outros podem ser administrados pelas vias transdérmica, percutânea, intravenosa, intramuscular, intranasal ou intrar-retal, em circunstâncias particulares. A via de administração pode ser varia-
5 da de qualquer maneira, limitada pelas propriedades físicas dos drogas e pela conveniência do paciente e do acompanhante.

Medição do Estado de Transcrição

De preferência, a medição do estado de transcrição é feita por hibridização às disposições do transcrito, que são descritas nesta subseção.
10 Certos outros métodos de medição do estado de transcrição são descritos posteriormente nesta subseção.

Disposições do Transcrito de um Modo Geral

Em uma modalidade da presente invenção, é feito o uso das "disposições do transcrito" (também chamadas "microdisposições" neste relatório). As disposições do transcrito podem ser empregadas para analisar
15 o estado de transcrição em uma célula.

Em uma modalidade, as disposições do transcrito são produzidas por hibridização de polinucleotídeos detectavelmente rotulados representando os transcritos de mRNA presentes em uma célula (por exemplo, cDNA fluorescentemente rotulado sintetizado do mRNA de célula total) para
20 uma microdisposição. Uma microdisposição é uma superfície com uma disposição de sítios de ligação ordenada (por exemplo, hibridização) para os produtos de muitos dos genes no genoma de uma célula ou organismo, preferivelmente a maioria ou quase todos os genes. As microdisposições
25 podem ser feitas de várias maneiras, dentre as quais diversas são descritas abaixo. Como quer que sejam produzidas, as microdisposições compartilham certas características: As disposições são reprodutíveis, permitindo que múltiplas cópias de uma dada disposição sejam produzidas e facilmente comparadas entre si. Preferivelmente, as microdisposições são pequenas,
30 usualmente menores do que 5 cm², e elas são produzidas de materiais que são estáveis sob condições de ligação (por exemplo, a hibridização de ácido nucléico). Um dado sítio de ligação ou conjunto singular de sítios de ligação

na microdisposição especificamente ligarão o produto de um gene único na célula. Não obstante possa haver mais do que um sítio de ligação físico (daqui por diante "sítio") por mRNA específico, por causa de clareza o exame abaixo admitirá que exista um sítio único. Em uma modalidade específica, 5 disposições tratáveis quanto à posição contendo ácidos nucleicos afixados de seqüência conhecida em cada localização, são usadas.

Observar-se-á que, quando o cDNA complementar ao RNA de uma célula é produzido e hibridizado em uma microdisposição sob condições de hibridização adequadas, o nível de hibridização ao sítio na disposição 10 correspondente a qualquer gene particular refletirá a predominância na célula de mRNA transcrito daquele gene. Por exemplo, quando detectavelmente rotulado (por exemplo com um fluoróforo), o cDNA complementar ao mRNA celular total é hibridizado a uma microdisposição, o sítio na disposição correspondente a um gene (isto é, capaz de especificamente ligar o 15 produto do gene) que não é transcrito na célula terá pouco ou nenhum sinal (por exemplo, sinal fluorescente), e um gene para o qual o mRNA codificado seja predominante terá um sinal relativamente forte.

Preparação de Microdisposições

As microdisposições são conhecidas na técnica e consistem em 20 uma superfície à qual as sondas que correspondem em seqüência aos produtos de genes (por exemplo, cDNAs, mRNAs, cRNAs, polipeptídeos e fragmentos destes) podem ser especificamente hibridizadas ou ligadas em uma posição conhecida. Em uma modalidade, a microdisposição é uma disposição (isto é, uma matriz) em que cada posição representa um sítio de 25 ligação discreta para um produto codificado por um gene (por exemplo, uma proteína ou RNA), e em que os sítios de ligação se acham presentes para produtos da maioria ou de quase todos os genes no genoma dos organismos. Em uma modalidade preferida, o "sítio de ligação" (daqui por diante, "sítio") é um ácido nucleico ou análogo de ácido nucleico ao qual um cDNA 30 cognato particular pode especificamente hibridizar-se. O ácido nucleico ou análogo do sítio de ligação pode ser, por exemplo, um oligômero sintético, um cDNA de comprimento completo, um cDNA menor do que o compri-

mento completo, ou um fragmento de gene.

Conquanto que em uma modalidade preferida a microdisposição contenha sítios de ligação para produtos de todos ou de quase todos os genes no genoma dos organismos alvo, tal compreensibilidade não é necessariamente exigida. Usualmente, a microdisposição terá sítios de ligação correspondentes a pelo menos cerca de 50 % dos genes no genoma, frequentemente pelo menos cerca de 75 %, mais frequentemente pelo menos cerca de 85 %, ainda mais frequentemente mais do que cerca de 90 %, e o mais freqüente pelo menos cerca de 99 %. De preferência, a microdisposição tem sítios de ligação para genes concernentes para testar e confirmar um modelo de rede biológica de interesse.

Um "gene" é identificado como uma matriz de leitura aberta (ORF) preferivelmente de pelo menos 50, 75 ou 99 aminoácidos, dos quais um RNA mensageiro é transcrito no organismo (por exemplo, se uma célula única) ou em alguma célula em um organismo multicelular. O número de genes em um genoma pode ser estimado a partir do número de mRNAs expressos pelo organismo, ou por extrapolação de uma porção bem-caracterizada do genoma. Quando o genoma do organismo de interesse tiver sido seqüenciado, o número de ORFs poderá ser determinado e as regiões de codificação do mRNA poderão ser identificadas por análise da seqüência de DNA. Por exemplo, o genoma de *Saccharomyces cerevisiae* foi completamente seqüenciado e é relatado como tendo aproximadamente 6275 matrizes de leitura aberta (ORFs) mais longas do que 99 aminoácidos. A análise destas ORFs indica que existem 5885 ORFs que são prováveis de especificar os produtos protéicos (Goffeau *et al.*, 1996, Life with 6000 genes, *Science* 274: 546-567, que é incorporado como referência em sua totalidade para todas as finalidades). Ao contrário, estima-se que o genoma humano contenha aproximadamente 100.000 genes.

Preparo dos Ácidos Nucléicos para as Microdisposições

Como observado acima, o "sítio de ligação" ao qual um cDNA cognato particular especificamente hibridiza, é usualmente um ácido nucléico ou análogo de ácido nucléico ligado naquele sítio de ligação. Em uma

modalidade, os sítios de ligação da microdisposição são polinucleotídeos de DNA correspondentes a pelo menos uma porção de cada gene em um genoma do organismo. Estes DNAs podem ser obtidos, por exemplo, por amplificação em reação em cadeia da polimerase (PCR) de segmentos de genes do DNA genômico, cDNA (por exemplo, por RT-PCR), ou seqüências clonadas. Os iniciadores da PCR são escolhidos com base na seqüência conhecida dos genes ou cDNA, que resultam em amplificação de fragmentos singulares (isto é, fragmentos que não compartilham mais do que 10 bases de seqüência idêntica contígua com qualquer outro fragmento na microdisposição). Os programas de computador são úteis no projeto de iniciadores com a especificidade necessária e propriedades de amplificação ótimas. Ver, por exemplo, Oligo pl versão 5.0 (National Bioscience). No caso de sítios de ligação correspondentes a genes muito longos, será algumas vezes desejável ampliar os segmentos perto da extremidade 3' do gene, de modo que, as sondas de cDNA iniciadas por oligo-dT, sejam hibridizadas à microdisposição; as sondas de comprimento menor do que o completo se ligarão eficientemente. Tipicamente cada fragmento de gene na microdisposição situar-se-á entre cerca de 50 pares de base e cerca de 2000 pares de base, mais tipicamente entre cerca de 100 pares de base e cerca de 1000 pares de base, e usualmente entre cerca de 300 pares de base e cerca de 800 pares de base, de comprimento. Os métodos de PCR são bem-conhecidos e são descritos, por exemplo, em Innis *et al.*, eds., 1990, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press Inc., San Diego, Califórnia, o qual fica incorporado como referência em sua totalidade, para todas as finalidades. Será evidente que os sistemas robóticos controlados por computador são úteis para isolar e amplificar ácidos nucléicos.

Um meio alternativo para gerar o ácido nucléico para a microdisposição é pela síntese de polinucleotídeos ou oligonucleotídeos sintéticos, por exemplo com o uso das químicas de N-fosfonato ou fosforamidita (Froehler *et al.*, 1986, *Nucleic Acid Res* 14: 5399-5407; McBride *et al.*, 1983, *Tetrahedron Lett.* 24: 245-248). As seqüências sintéticas situam-se entre cerca de 15 e cerca de 500 bases de comprimento, mais tipicamente entre

cerca de 20 e cerca de 50 bases. Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos sintéticos incluem bases não-naturais, por exemplo a inosina. Como observado acima, os análogos de ácido nucleico podem ser usados como sítios de ligação para hibridização. Um exemplo de um análogo de ácido nucleico adequado é o ácido nucleico peptídico (ver, por exemplo, Egholm *et al.*, 1993, PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules, *Nature* 365: 566-568; ver também a Patente U.S. nº 5.539.083).

Em uma modalidade alternativa, os sítios de ligação (hibridização) são produzidos de clones de genes de plasmídeo ou de fago, cDNAs (por exemplo rótulos de seqüências expressas), ou insertos destes (Nguyen *et al.*, 1995, Differential gene expression in the murine thymus assayed by quantitative hybridization of arrayed cDNA clones, *Genomics* 29: 207-209). Em ainda outra modalidade, o polinucleotídeo dos sítios de ligação é RNA.

Ligação de Ácidos Nucleicos à Superfície Sólida

O ácido nucleico ou análogo são ligados a um suporte sólido, que pode ser produzido de vidro, plástico (por exemplo, polipropileno, náilon), poliacrilamida, nitrocelulose ou outros materiais. Um método preferido para ligar os ácidos nucleicos a uma superfície é por estampagem sobre placas de vidro, como é descrito em geral por Schena *et al.*, 1995, Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray, *Science* 270: 467-470. Este método é especialmente útil para preparar microdisposições de cDNA. Ver, também, DeRisi *et al.*, 1996, Use of a cDNA microarray to analyze gene expression patterns in human cancer, *Nature Genetics* 14: 457-460; Shalon *et al.*, 1996, A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization, *Genome Res.* 6: 639-645; e Schena *et al.*, 1995, Parallel human genome analysis; microarray-based expression of 1000 genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10539-11286. Cada um dos artigos acima mencionados fica incorporado como referência em sua totalidade para todas as finalidades.

Um segundo método preferido para produzir microdisposições é

pela produção de disposições de oligonucleotídeos de alta densidade. Técnicas são conhecidas para produzir disposições contendo milhares de oligonucleotídeos complementares às seqüências definidas, em localizações definidas sobre uma superfície com o uso de técnicas fotolitográficas para a síntese *in situ* (ver Fodor *et al.*, 1991, Light-direct spatially addressable parallel chemical synthesis, *Science* 251: 767-773; Pease *et al.*, 1994, Light-directed oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5022-5026; Lockhart *et al.*, 1996, Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays, *Nature Biotech* 14: 1675; Patente U.S. nºs 5.578.832, 5.556.752 e 5.510.270, cada uma das quais ficando aqui incorporada como referência em sua totalidade para todas as finalidades) ou outros métodos para a síntese e deposição rápidas de oligonucleotídeos definidos (Blanchard *et al.*, 1996, High-Density Oligonucleotide arrays, *Biosensors & Bioelectronics* 11: 687-690). Quando estes métodos são usados, os oligonucleotídeos (por exemplo, 20-meros) de seqüência conhecida são sintetizados diretamente sobre uma superfície, tal como uma lâmina de vidro derivada. Usualmente, a disposição produzida é redundante, com várias moléculas de oligonucleotídeos por RNA. As sondas de oligonucleotídeos podem ser escolhidas para detectar mRNAs alternativamente encaixados.

Outros métodos para produzir microdisposições, por exemplo por mascaramento (Maskos e Southern, 1992, *Nuc. Acids Res.* 20: 1679-1684), podem também ser usados. Principalmente, qualquer tipo de disposição, por exemplo, manchas de pontos sobre uma membrana de hibridização de náilon (ver Sambrook *et al.*, Molecular Cloning—A Laboratory Manual (2ª Ed.), Vol. 1 a 3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989, que fica incorporada em sua totalidade para todas as finalidades), pode ser usado, embora, como será reconhecido por aqueles versados na técnica, disposições muitas pequenas sejam preferidas, tendo em vista que os volumes de hibridização serão menores.

Geração de Sondas Rotuladas

Métodos para preparar RNA total e poli (A)+ são bem-conhe-

cidos e são descritos de uma forma geral em Sambrook *et al.*, acima. Em uma modalidade, o RNA é extraído de células dos vários tipos de interesse nesta invenção, com o uso de lise de tiocianato de guanidínio, seguida por centrifugação de CsCl (Chirgwin *et al.*, 1979, *Biochemistry* 18: 5294-5299).

5 O RNA poli (A)+ é selecionado mediante seleção com celulose oligo-dT (ver Sambrook *et al.*, acima). As células de interesse incluem células do tipo selvagem, células do tipo selvagem expostas a drogas, células com constituinte(s) celular(es) modificadas/perturbadas, e células expostas a droga com constituinte(s) celular(es) modificadas/ perturbadas.

10 O cDNA rotulado é preparado a partir do mRNA por transcrição reversa oligo dT-iniciada ou aleatoriamente iniciada, ambas as quais sendo bem-conhecidas na técnica (ver, por exemplo, Klug e Berger, 1987, *Methods Enzymol.* 152: 316-325). A transcrição reversa pode ser realizada na presença de um dNTP conjugado a um rótulo detectável, mais preferivelmente
15 a um dNTP fluorescentemente rotulado. Alternativamente, o mRNA isolado pode ser transformado em RNA antisentido rotulado sintetizado por transcrição *in vitro* de cDNA de duplo filamento na presença de dNTPs rotulados (Lockhart *et al.*, 1996, Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays, *Nature Biotech.* 14: 1675, que é incorporado como
20 referência em sua totalidade para todas as finalidades). Nas modalidades alternativas, a sonda de cDNA ou de RNA pode ser sintetizada na ausência de rótulo detectável e pode ser rotulada subsequente, por exemplo pela incorporação de dNTPs ou rNTP biotinilados, ou por algum meio semelhante (por exemplo, a fotorreticulação de um derivado de psoralen de
25 biotina em RNAs), seguido pela adição de estreptavidina rotulada (por exemplo, a estreptavidina conjugada à ficoeritrina) ou o equivalente.

Quando sondas fluorescentemente rotuladas são usadas, muitos fluoróforos adequados são conhecidos, incluindo a fluoresceína, a lissamina, a ficoeritrina, rodamina (Perkin Elmer Cetus), Cy2, Cy3, Cy3,5, Cy5,
30 Cy5,5, Cy7, FluorX (Amersham) e outros (ver, por exemplo, Kricka, 1992, Nonisotopic DNA Probe Techniques, Academic Press San Diego, Califórnia). Observar-se-á que são escolhidos pares de fluoróforos que têm espectros

de emissão distintos de modo que eles possam ser facilmente distinguidos.

Em outra modalidade, um rótulo que não um rótulo fluorescente é usado. Por exemplo, um rótulo radioativo, ou um par de rótulos radioativos com espectros de emissão distintos pode ser usado (ver Zhao *et al.*, 1995, High density cDNA filter analysis: a novel approach for large-scale, quantitative analysis of gene expression, *Gene* 156: 207; Pietu *et al.*, 1996, Novel gene transcripts preferentially expressed in human muscles revealed by quantitative hybridization of a high density cDNA array, *Genome Res.* 6: 492). Entretanto, por causa da dispersão das partículas radioativas, e da conseqüente exigência quanto a sítios de ligação amplamente espaçados, o uso de radioisótopos é uma modalidade menos preferida.

Em uma modalidade, o cDNA rotulado é sintetizado por incubação de uma mistura contendo dGTP 0,5 mM, dATP e dCTP mais dTTP 0,1 mM mais desoxirribonucleotídeos fluorescentes [por exemplo, Rodamina 0,1 mM 110 UTP (Perkin Elmer Cetus) ou Cy3 0,1 mM dUTP (Amersham)] com transcriptase reversa (por exemplo, SuperScript. TM. II, LTI Inc.) em 42 °C por 60 minutos.

Hibridização a Microdisposições

A hibridização de ácido nucléico e as condições de lavagem são escolhidas de modo que a sonda "especificamente se ligue" ou "especificamente hibridize" a um sítio de disposição específico, isto é, a sonda hibridiza, duplica ou se liga a um sítio de disposição da seqüência com uma seqüência de ácido nucléico não-complementar, mas não hibridiza a um sítio com uma seqüência de ácido nucléico complementar. Como aqui usado, uma seqüência de polinucleotídeo é considerada complementar a uma outra quando, se o mais curto dos polinucleotídeos for menor ou igual a 25 bases, não existir nenhuma ligação imperfeita com o uso de regras padrão de pareamento de bases ou, se o mais curto dos polinucleotídeos for mais longo do que 25 bases, não existir mais do que uma ligação imperfeita de 5 %. De preferência, os polinucleotídeos são perfeitamente complementares (sem ligações imperfeitas). Pode facilmente ser demonstrado que as condições de hibridização específicas resultam em hibridização específica mediante a

realização de um ensaio de hibridização que inclua controles negativos (ver, por exemplo, Shalon *et al.*, acima, e Chee *et al.*, acima).

As condições de hibridização ótimas dependerão do comprimento (por exemplo, oligômero versus polinucleotídeo maior do que 200 bases) e do tipo (por exemplo, RNA, DNA, PNA) da sonda rotulada e do polinucleotídeo ou oligonucleotídeo imobilizados. Parâmetros gerais para condições de hibridização específicas (isto é, severas) para os ácidos nucleicos são descritas em Sambrook *et al.*, supra, e em Ausubel *et al.*, 1987, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, que fica incorporado em sua totalidade para todas as finalidades. Quando as microdisposições do cDNA de Schena *et al.* são usadas, as condições de hibridização típicas são a hibridização em 5 X SSC mais SDS 0,2 % a 65 °C por 4 horas, seguida por lavagens a 25 °C em tampão de lavagem de baixa severidade (1 X SSC mais SDS 0,2 %) seguido por 10 minutos a 25 °C em tampão de lavagem de alta severidade (0,1 X SSC mais SDS 0,2 %) (Shena *et al.*, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 10614). Condições de hibridização úteis são também fornecidas, por exemplo, em Tijessen, 1993, *Hybridization With Nucleic Acid Probes*, Elsevier Science Publishers B. V. e Kricka, 1992, *Nonisotopic DNA Probe Techniques*, Academic Press San Diego, Califórnia.

Deteção de Sinal e Análise de Dados

Quando sondas fluorescentemente rotuladas são usadas, as emissões de fluorescência em cada sítio de uma disposição de transcrito podem ser, de preferência, detectadas por microscopia a laser confocal de varredura. Em uma modalidade, uma varredura separada, com o uso da linha de excitação apropriada, é realizada para cada um dos dois fluoróforos usados. Alternativamente, pode ser usado um laser que permita a iluminação do espécime em comprimentos de onda específicos para os fluoróforos usados, e as emissões do fluoróforo podem ser analisadas. Em uma modalidade preferida, as disposições são varridas com um escâner fluorescente a laser com um estágio X-Y controlado por computador e uma objetiva de microscópio. A excitação seqüencial do fluoróforo é obtida com um laser a gás

misto multilinear, e a luz emitida é cindida por comprimento de onda e detectada com um tubo fotomultiplicador. Os dispositivos de varredura a laser de fluorescência são descritos em Schena *et al.*, 1996, *Genoma Res.* 6: 639-645 e em outras referências citadas neste relatório. Alternativamente, o feixe da óptica de fibras descrito por Ferguson *et al.*, 1996, *Nature Biotech.* 14: 1681-1684, pode ser usado para monitorar os níveis de abundância de mRNA em um grande número de sítios simultaneamente.

Os sinais são registrados e, em uma modalidade preferida, analisados por computador, por exemplo com o uso de um análogo de 12 bits para a placa digital. Em uma modalidade, a imagem explorada é limpa de manchas com o uso de um programa de gráficos (por exemplo, Hijaak Graphics Suite) e depois analisada usando-se um programa de quadriculação de imagem que produz uma folha de dispersão da hibridização média em cada comprimento de onda em cada sítio.

Se necessário, uma correção experimentalmente determinada para a "diafonia" (ou superposição) entre os canais para os dois fluoróforos pode ser feita. Para qualquer sítio de hibridização particular sobre a disposição do transcrito, uma relação da emissão dos dois fluoróforos é preferivelmente calculada. A relação é independente do nível de expressão absoluta do gene cognato, mas é útil para genes cuja expressão seja significativamente modulada pela administração da droga, deleção de genes ou qualquer outro evento testado.

Preferivelmente, além de identificar uma perturbação como positiva ou negativa, é vantajoso determinar a grandeza da perturbação. Isto pode ser realizado por métodos que sejam facilmente evidentes para aqueles versados na técnica.

Outros Métodos de Medição do Estado Transcricional

O estado transcricional de uma célula pode ser medido por outras tecnologias de expressão de genes conhecidas na técnica.

30 ANÁLISE DE NÍVEIS DE mRNA À BASE DE TAQMAN®

O ensaio de RT-PCR (PCR quantitativa de tempo real) utiliza uma transcriptase reversa de RNA para catalisar a síntese de um filamento

de DNA a partir de um filamento de RNA, incluindo um filamento de mRNA. O DNA resultante pode ser especificamente detectado e quantificado e este processo pode ser usado para determinar os níveis de espécies específicas de mRNA. Um método para fazer isto é conhecido sob a marca comercial de

5 TAQMAN (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) e explora a atividade de 5' nuclease da AMPLI TAQ GOLD® DNA Polimerase para clivar uma forma específica de sonda durante uma reação de PCR. Isto é referido como uma sonda TAQMAN®. Ver Luthra, R. *et al.*, Novel 5' exonuclease-based real-time PCR assay for the detection of t(14;18)(q32;q21) em pacientes com

10 linfoma folicular, *Am J Pathol.*, Volume 153, (1998), páginas 63 a 68). A sonda consiste em um oligonucleotídeo (usualmente $\approx$ 20-mero) com um corante 5'-repórter e um corante 3'-resfriador brusco. O corante repórter fluorescente, tal como FAM (6-carboxifluoresceína), é covalentemente ligado à extremidade 5' do oligonucleotídeo. O repórter é resfriado bruscamente por

15 TAMRA (6-carbóxi-N,N,N',N'-tetrametilrodamina) ligada através de um braço ligante que é localizado na extremidade 3'. Ver Kuimelis R. G. *et al.*, Structural analogues of TaqMan probes for real-time quantitative PCR, *Nucleic Acids Symp Ser.*, Volume 37, (1997), páginas 255 a 256, e Mullah, B. *et al.*, Efficient synthesis of double dye-labeled oligodeoxyribonucleotide probes and their application in a real time PCR assay., *Nucleic Acids Res.*, Volume

20 15, (1998), páginas 1026 a 1031. Durante a reação, a clivagem da sonda separa o corante repórter e o corante resfriador brusco, resultando em fluorescência aumentada do repórter.

O acúmulo de produtos da PCR é detectado diretamente pela

25 monitoração do aumento na fluorescência do corante repórter. Ver Heid, C. A. *et al.*, Real time quantitative PCR., *Genome Res.*, Volume 6, (1996), páginas 986 a 994). As reações são caracterizadas pelo ponto no tempo durante a ciclização quando a amplificação de um produto da PCR é primeiro detectada, ao invés da quantidade de produto da PCR acumulada após um

30 número fixo de ciclos. Quanto mais elevado o número de cópias de partida do alvo de ácido nucléico, mais cedo um aumento significativo na fluorescência é observado. Ver Gibson, U.E. *et al.*, A novel method for real time

quantitative RT-PCR, *Genome Res.*, Volume 6 (1996), páginas 995 a 1001.

Quando a sonda está intacta, a proximidade do corante repórter ao corante resfriador brusco resulta na supressão da fluorescência repórter mediante transferência de energia do tipo Förster. Ver Lakowicz, J. R. *et al.*,
 5 Oxygen quenching and fluorescence depolarization of tyrosine residues in proteins, *J Biol Chem.*, Volume 258, (1983), páginas 4794 a 4801. Durante a PCR, se o alvo de interesse estiver presente, a sonda especificamente trata pelo calor entre os sítios iniciadores dianteiros e reversos. A atividade nucleolítica de 5'–3' da AMPLITAQ GOLD® DNA Polimerase cliva a sonda entre o repórter e o resfriador brusco apenas se a sonda hibridizar ao alvo. Os
 10 fragmentos da sonda são então deslocados do alvo, e a polimerização do filamento continua. Este processo ocorre em cada ciclo e não interfere com o acúmulo exponencial do produto. A extremidade 3' da sonda é bloqueada para impedir a extensão da sonda durante a PCR.

15 A referência passiva é um corante incluído no Tampão TA-QMAN® e não participa no ensaio de 5' nuclease. A referência passiva fornece uma referência interna à qual o sinal do corante repórter pode ser normalizado durante a análise de dados. A normalização é necessária para corrigir quanto as flutuações fluorescentes por causa das mudanças na con-
 20 centração ou no volume.

A normalização é realizada mediante a divisão da intensidade da emissão do corante repórter pela intensidade da emissão da referência passiva para se obter uma relação definida como o R_n (repórter normalizado) para um dado tubo de reação.

25 O ciclo limite ou valor C_t é o ciclo em que um aumento estatisticamente significativo no ΔR_n é primeiro detectado. Em um gráfico de R_n versus o número de ciclos, o ciclo limite ocorre quando a aplicação da detecção da seqüência começa a detectar o aumento no sinal associado com um crescimento exponencial do produto da PCR.

30 Para realizar as medições quantitativas, diluições em série de um cRNA (padrão) são incluídas em cada experiência, de modo a construir-se uma curva padrão necessária para a quantificação precisa e rápida do

mRNA. De modo a estimar-se a reprodutibilidade da técnica, a amplificação simples do mesmo cRNA pode ser realizada múltiplas vezes.

Outras tecnologias para medir o estado transcricional de uma célula produz fundos gerais de fragmentos de restrição de complexidade limitada para a análise eletroforética, tais como os métodos que combinam a digestão de enzima de restrição dupla com iniciadores de fase (ver, por exemplo, a Patente Européia 0 534858 A1, depositada em 24 de setembro de 1992, por Zabeau *et al.*), ou métodos que selecionam fragmentos de restrição com sítios mais próximos de uma extremidade definida do mRNA (ver, por exemplo, Prashar *et al.*, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 659-663).

Outros métodos estatisticamente tiram amostras dos fundos gerais de cDNA, tal como mediante bases suficientes de seqüenciação (por exemplo, 20 a 50 bases) em cada um dos cDNAs múltiplos para identificar cada cDNA, ou por rótulos curtos de seqüenciação (por exemplo, 9 a 10 bases) que são geradas em posições conhecidas em relação a uma extremidade do mRNA definida (ver, por exemplo, Velculescu, 1995, *Science* 270: 484-487).

Medição de Outros Aspectos

Em várias modalidades da presente invenção, os aspectos dos outros estados biológicos que não o estado transcricional, tais como o estado translacional, ou aspectos mistos, podem ser medidos de modo a obter-se respostas a drogas e caminhos. Detalhes destas modalidades são descritos nesta seção.

Medições do Estado Translacional

A expressão da proteína codificada pelo(s) gene(s) pode ser detectada por uma sonda que seja detectavelmente rotulada, ou que possa ser subseqüentemente rotulada. Geralmente, a sonda é um anticorpo que reconhece a proteína expressa.

Como aqui usado, o termo anticorpo inclui, sem limitação, anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, anticorpos humanizados ou quiméricos, e fragmentos de anticorpos biologicamente funcionais suficientes para ligação do fragmento de anticorpos à proteína.

Para a produção de anticorpos a uma proteína codificada por um dos genes apresentados, vários animais hospedeiros podem ser imunizados por injeção com o polipeptídeo, ou uma porção deste. Tais animais hospedeiros podem incluir, sem que a estes fiquem limitados, coelhos, camundongos e ratos, apenas para citar alguns. Vários adjuvantes podem ser usados para aumentar a resposta imunológica, dependendo da espécie hospedeira, incluindo, sem limitar, adjuvante de Freund (completo e incompleto), géis minerais tais como o hidróxido de alumínio, substâncias tensoativas tais como a liolecitina, os polióis plurônicos, poliânions, peptídeos, emulsões oleosas, a hemocianina de lapa buraco de fechadura, dinitrofenol, e adjuvantes humanos potencialmente úteis, tais como BCG (*bacille Calmette-Guerin*) e *Corynebacterium parvum*.

Anticorpos policlonais são populações heterogêneas de moléculas de anticorpos derivados dos soros de animais imunizados com um antígeno, tal como o produto de genes alvo, ou um seu derivado funcional antigênico. Para a produção de anticorpos policlonais, animais hospedeiros, tais como aqueles descritos acima, podem ser imunizados por injeção com a proteína codificada, ou uma porção desta, suplementada com adjuvantes, como também descrito acima.

Os anticorpos monoclonais (mAbs), que são populações homogêneas de anticorpos a um antígeno particular, podem ser obtidos por qualquer técnica que leve em conta a produção de moléculas de anticorpos mediante linhagens celulares contínuas em cultura. Estas incluem, sem que fiquem limitadas, a técnica de hibridoma de Kohler e Milstein, *Nature*, 256: 495-497 (1975); e a Patente U.S. nº 4.376.110. A técnica de hibridoma de células B humanas de Kosbor *et al.*, *Immunology Today*, 4: 72 (1983); Cole *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 2026-2030 (1983); e a técnica de hibridoma EBV, Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., páginas 77 a 96 (1985). Tais anticorpos podem ser de qualquer classe de imunoglobulina, incluindo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD e qualquer uma de suas subclasses. O hibridoma que produz o mAb desta invenção pode ser cultivado *in vitro* ou *in vivo*. A produção de altos títulos de mAbs *in vivo*

torna este o método de produção presentemente preferido.

Além disso, as técnicas desenvolvidas para a produção de "anticorpos quiméricos", Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984); Neuberger *et al.*, *Nature*, 312: 604-608 (1984); Takeda *et al.*,
5 *Nature*, 314: 452-454 (1985), mediante junção dos genes de uma molécula de anticorpo de camundongo de especificidade apropriada de antígeno, com genes de uma molécula de anticorpo humana de atividade biológica apropriada, podem ser usadas. Um anticorpo quimérico é uma molécula em que porções diferentes são derivadas de diferentes espécies de animais, tais
10 como aquelas que têm uma região variável ou hipervariável derivada de um mAb murino e uma região constante de imunoglobulina humana.

Alternativamente, as técnicas descritas para a produção de anticorpos de cadeia única, Patente U.S. nº 4.946.778; Bird, *Science*, 242: 423-426 (1988); Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5879-5883 (1988);
15 e Ward *et al.*, *Nature*, 334: 544-546 (1989), podem ser adaptadas para produzir anticorpos de cadeia única de gene diferencialmente expresso. Os anticorpos de cadeia única são formados pela ligação de fragmentos de cadeia pesada e leve da região Fv através de uma ponte de aminoácido, resultando em um polipeptídeo de cadeia única.

20 Mais preferivelmente, as técnicas úteis para a produção de "anticorpos humanizados" podem ser adaptadas para produzir anticorpos às proteínas, seus fragmentos ou derivados. Tais técnicas são apresentadas nas Patentes U.S. nºs 5.932.448, 5.693.762, 5.693.761, 5.585.089, 5.530.101, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.789.650, 5.661.016 e 5.770.429.

25 Os fragmentos de anticorpos, que reconheçam epitopos específicos, podem ser gerados por técnicas conhecidas. Por exemplo, essas fragmentos incluem, sem que a estes se limitem, os fragmentos F(ab')₂ que podem ser produzidos pela digestão da pepsina da molécula de anticorpo, e os fragmentos Fab que podem ser gerados pela redução das pontes dissulfeto dos fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, as bibliotecas de expressão de Fab podem ser construídas, Huse *et al.*, *Science*, 246: 1275-1281 (1989),
30 para possibilitar rápida e fácil identificação de fragmentos Fab monoclonais

com a especificidade desejada.

A extensão em que as proteínas conhecidas são expressas na amostra é então determinada por métodos de imunoensaios que utilizam os anticorpos descritos acima. Tais métodos de imunoensaios incluem, sem
5 que a estes se limitem, manchas-pontos, Western blot, ensaios de ligação protéica competitivos e não competitivos, ensaios imunoabsorventes ligados a enzima (ELISA), imunoistoquímica, separador celular ativado por fluorescência (FACS), e outros comumente usados e amplamente descritos na literatura científica e de patentes, e muitos comercialmente empregados.

10 Particularmente preferido, para facilidade de detecção, é o ELISA de sanduíche, do qual diversas variações existem, todas as quais se pretende sejam abrangidas pela presente invenção. Por exemplo, em um ensaio dianteiro típico, o anticorpo não rotulado é imobilizado em um substrato sólido e a amostra a ser testada é colocada em contato com a molécula ligada após um período de incubação adequado, por um período de
15 tempo suficiente para possibilitar a formação de um complexo binário de anticorpo-antígeno. Neste ponto, um segundo anticorpo, rotulado com uma molécula repórter capaz de induzir um sinal detectável, é então adicionado e incubado, permitindo tempo suficiente para a formação de um complexo ternário de anticorpo-antígeno-anticorpo rotulado. Qualquer material não reagido é removido por lavagem, e a presença do antígeno é determinada por observação de um sinal, ou pode ser quantificada mediante comparação com uma amostra de controle contendo quantidades conhecidas de antígeno. As variações no ensaio dianteiro incluem o ensaio simultâneo, em que
20 tanto a amostra quanto o anticorpo são adicionados simultaneamente ao anticorpo ligado, ou um ensaio reverso em que o anticorpo rotulado e a amostra a ser testada são primeiro combinados, incubados e adicionados ao anticorpo ligado à superfície não rotulada. Estas técnicas são bem-conhecidas daqueles versados na prática, e a possibilidade de variações secundárias será facilmente evidente. Como aqui usado, "ensaio de sanduíche" intenta abranger todas as variações na técnica básica de dois sítios. Quanto aos imunoensaios da presente invenção, o único fator de limitação é
25
30

que o anticorpo rotulado deve ser um anticorpo que seja específico para a proteína expressa pelo gene de interesse.

As moléculas repórteres mais comumente usadas neste tipo de ensaio são ou enzimas, moléculas contendo fluróforo ou radionuclídeos. No caso de um imunoensaio de enzima, uma enzima é conjugada ao segundo anticorpo, usualmente por meio de glutaraldeído ou periodato. Como será facilmente reconhecido, no entanto, uma ampla variedade de diferentes técnicas de ligação existe, as quais são bem-conhecidas do técnico versado. As enzimas comumente usadas incluem a peroxidase da raiz forte, a glicose oxidase, a beta-galactosidase e a fosfatase alcalina, entre outras. Os substratos a ser usados com as enzimas específicas são geralmente escolhidos para a produção, após a hidrólise pela correspondente enzima, de uma mudança de cor detectável. Por exemplo, o p-nitrofenil fosfato é adequado para uso com os conjugados de fosfatase alcalina; para os conjugados de peroxidase, 1,2-fenilenodiamina ou toluidina são comumente usados. É também possível empregar substratos fluorogênicos, os quais produzem um produto fluorescente, ao invés dos substratos cromogênicos observados acima. Uma solução que contenha o substrato apropriado é então adicionada ao complexo terciário. O substrato reage com a enzima ligada ao segundo anticorpo, dando um sinal visual qualitativo, o qual pode ainda ser quantificado, usualmente espectrofotometricamente, para dar uma avaliação da quantidade de proteína que está presente na amostra de soro.

Alternativamente, os compostos fluorescentes, tais como a fluoresceína e a rodamina, podem ser quimicamente acoplados a anticorpos sem alterar sua capacidade de ligação. Quando ativado por iluminação com luz de um comprimento de onda particular, o anticorpo rotulado com fluorocromo absorve a energia da luz, induzindo a um estado de excitabilidade na molécula, seguido por emissão da luz em um comprimento de onda característico mais longo. A emissão aparece como uma cor característica visualmente detectável com um microscópio óptico. As técnicas de imunofluorescência e de EIA são ambas muito bem estabelecidas na prática e são particularmente preferidas para o presente método. No entanto, outras moléculas

las repórteres, tais como radioisótopos, moléculas quimioluminescentes ou bioluminescentes também podem ser empregadas. Será facilmente evidente ao técnico versado como variar o procedimento para adequar o uso necessário.

5 A medição do estado translacional também pode ser realizada de acordo com vários métodos adicionais. Por exemplo, a monitoração genômica completa da proteína (isto é, o "proteoma", Goffeau *et al.*, acima) pode ser realizada pela construção de uma microdisposição em que os sítios de ligação compreendam anticorpos imobilizados, de preferência mono-
10 clonais, específicos a uma pluralidade de espécies de proteínas codificadas pelo genoma celular. Preferivelmente, os anticorpos estão presentes para uma fração substancial das proteínas codificadas, ou pelo menos para aquelas proteínas pertinentes para testar ou confirmar um modelo de rede biológica de interesse. Os métodos para produzir anticorpos monoclonais
15 são bem-conhecidos (ver, por exemplo, Harlow e Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., que é incorporado em sua totalidade para todos os fins). Em uma modalidade preferida, os anticorpos monoclonais são criados contra os fragmentos de peptídeos sintéticos projetados com base na sequência genômica da célula. Com uma tal disposi-
20 ção de anticorpo, as proteínas da célula são colocadas em contato com a disposição, e sua ligação é ensaiada em ensaios conhecidos na técnica.

 Alternativamente, as proteínas podem ser separadas por sistemas de eletroforese em gel bidimensional. A eletroforese em gel bidimensional é bem-conhecida na técnica e tipicamente envolve a focalização isoe-
25 létrica ao longo de uma primeira dimensão, seguida por eletroforese de SDS-PAGE ao longo de uma segunda dimensão. Ver, por exemplo, Hames *et al.*, 1990, *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*, IRL Press, New York; Shevchenko *et al.*, 1996, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 93: 1440-1445; Sagliocco *et al.*, 1996, *Yeast* 12: 1519-1533; Lander, 1996, *Science* 274: 536-539. Os eletroferogramas resultantes podem ser analisados
30 por numerosas técnicas que incluem técnicas espectrométricas de massa, Western blotting e análise de imunoblot com o uso de anticorpos policlonais

e monoclonais, e micro-seqüenciamento interno e N-terminal. Com o uso destas técnicas, é possível identificar uma fração substancial de todas as proteínas produzidas sob dadas condições fisiológicas, inclusive nas células (por exemplo, na levedura) expostas a uma droga, ou nas células modificadas, por exemplo, por deleção ou superexpressão de um gene específico.

Modalidades à Base de Outros Aspectos do Estado Biológico

Embora a monitoração dos constituintes celulares outros que não as abundâncias de mRNA correntemente apresente certas dificuldades técnicas não encontradas na monitoração dos mRNAs, será evidente àqueles versados na técnica que no uso dos métodos desta invenção as atividades de proteínas relevantes para a caracterização da função celular podem ser medidas, e as modalidades desta invenção podem basear-se em tais medições. As medições da atividade podem ser realizadas por qualquer meio funcional, bioquímico ou físico apropriado à atividade particular que esteja sendo caracterizada. Quando a atividade envolve uma transformação química, a proteína celular pode ser colocada em contato com os substratos naturais, e a taxa de transformação pode ser medida. Quando a atividade envolve a associação em unidades multiméricas, por exemplo a associação de um complexo de ligação de DNA ativado com DNA, a quantidade de proteína associada ou as conseqüências secundárias da associação, tais como quantidades de mRNA transcritas, pode ser medida. Igualmente, quando apenas uma atividade funcional seja conhecida, por exemplo, como no controle do ciclo celular, o desempenho da função pode ser observado. Não obstante conhecidas e medidas, as mudanças nas atividades das proteínas formam os dados de resposta analisados pelos métodos supracitados desta invenção.

Em modalidades alternativas e não limitativas, os dados de resposta podem ser formados de aspectos mistos do estado biológico de uma célula. Os dados de resposta podem ser construídos de, por exemplo, mudanças em certas abundâncias de mRNA, mudanças em certas abundâncias de proteínas, e mudanças em certas atividades das proteínas.

A Detecção de Ácidos Nucléicos e Proteínas Como Marcadores

Em uma modalidade particular, o nível de mRNA correspondente ao marcador pode ser determinado em formatos tanto por *in situ* quanto por *in vitro* em uma amostra biológica usando métodos conhecidos na técnica. O termo "amostra biológica" é pretendido incluir tecidos, células, fluidos biológicos e isolados destes, separados de um paciente, assim como tecidos, células e fluidos presentes dentro de um paciente. Muitos métodos de detecção da expressão usam RNA isolado. Para os métodos *in vitro*, qualquer técnica de isolamento de RNA que não seleciona junto ao isolamento de mRNA pode ser utilizado para a purificação de RNA a partir das células (ver, por exemplo, Ausubel, et al., Ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York (1987-1999). Adicionalmente, grandes números de amostras de tecido podem facilmente ser processados usando as técnicas bem-conhecidas para aqueles versados na técnica, tais como, o processo de isolamento de RNA de etapa única de Chomczynski, Patente U.S. número 4.843.155 (1989).

O mRNA isolado pode ser usado nas análises de hibridização ou amplificação que incluem, mas não são limitados a eles, análises de Southern ou Northern, análises de reação da cadeia polimerase e disposições de sonda. Um método de diagnóstico preferido para a detecção de níveis de mRNA envolve o contato do mRNA isolado com uma molécula de ácido nucléico (sonda) que pode hibridizar com o mRNA codificado pelo gene sendo detectado. A sonda de ácido nucléico pode ser, por exemplo, um cDNA de comprimento total, ou uma parte deste, tal como um oligonucleotídeo de pelo menos 7, 15, 30, 50, 100, 250 ou 500 nucleotídeos no comprimento e suficientes para especificamente se hibridizar sob condições estritas em um mRNA ou DNA genômico que codifica um marcador da presente invenção. Outras sondas adequadas para uso nas análises de diagnóstico da invenção são aqui descritas. A hibridização de um mRNA com a sonda indica que o marcador em questão está sendo expresso.

Em um formato, o mRNA é imobilizado em uma superfície sólida e colocado em contato com uma sonda, por exemplo, por dirigir o mRNA

isolado sobre um gel de agarose e transferir o mRNA do gel para uma membrana, tal como nitrocelulose. Em um formato alternativo, a(s) sonda(s) são imobilizadas sobre uma superfície sólida e o mRNA é colocado em contato com a(s) sonda(s), por exemplo, em uma disposição de fragmento de gene

5 Affymetrix. Um versado pode facilmente adaptar os métodos conhecidos de detecção de mRNA para uso na detecção do nível de mRNA codificado pelos marcadores da presente invenção.

Um método alternativo para se determinar o nível de mRNA correspondente a um marcador da presente invenção em uma amostra envolve

10 o processo de amplificação de ácido nucléico, por exemplo, por RT-PCR (a modalidade experimental apresentada em Mullis, Patente U.S. número 4.683.202 (1987); reação da cadeia ligase, Barany, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:189-193 (1991); replicação da seqüência auto-sustentada, Guatelli et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 1874-1878 (1990); sistema de amplificação transcricional, Kwoh et al., *Proc. Natl. Ac. Sci. USA*, 86: 1173-1177

15 (1989); Q-Beta Replicase, Lizardi et al., *Bio/Technology*, 6:1197 (1988); replicação do círculo de rolagem, Lizardi et al., Patente U.S. número 5.854.033 (1988); ou qualquer outro método de amplificação de ácido nucléico, seguido pela detecção das moléculas amplificadas usando técnicas

20 bem-conhecidas por aqueles versados na técnica. Estes esquemas de detecção são especialmente úteis para a detecção das moléculas de ácido nucléico se tais moléculas estiverem presentes em números muito baixos. Como aqui usado, os iniciadores de amplificação são definidos como sendo um par de moléculas de ácido nucléico que pode se associar com as regi-

25 ões 5' ou 3' de um gene (mais e menos filamentos, respectivamente, ou vice-versa) e contém uma região curta no meio. Em geral, os iniciadores da amplificação são de cerca de 10 a 30 nucleotídeos no comprimento e flaqueiam uma região de cerca de 50 a 200 nucleotídeos de comprimento. Sob condições apropriadas e com reagentes apropriados, tais iniciadores permi-

30 tem a amplificação de uma molécula de ácido nucléico que compreende a seqüência de nucleotídeo flanqueada pelos iniciadores.

Para os métodos *in situ*, o mRNA não necessita ser isolado das

células antes da detecção. Em tais métodos, uma amostra de célula ou tecido é preparada/processada usando métodos histológicos conhecidos. A amostra é depois imobilizada sobre um suporte, tipicamente uma lâmina de vidro, e depois colocada em contato com uma sonda que pode hibridizar em mRNA que codifica o marcador.

Como uma alternativa para formar determinações com base no nível de expressão absoluto do marcador, as determinações podem ser baseadas no nível de expressão normalizado do marcador. Os níveis de expressão são normalizados por corrigir o nível de expressão absoluto de um marcador mediante a comparação de sua expressão com a expressão de um gene que não é um marcador, por exemplo, um gene de manutenção que é de maneira constitutiva expresso. Os genes adequados para a normalização incluem genes de manutenção tais como o gene de actina, ou genes específicos da célula epitelial. Esta normalização permite a comparação do nível de expressão em uma amostra, por exemplo, uma amostra do paciente, para outra amostra, ou entre amostras de fontes diferentes.

Alternativamente, o nível de expressão pode ser fornecido como um nível de expressão relativa. Para se determinar um nível de expressão relativa de um marcador, o nível de expressão do marcador é determinado com relação a 10 ou mais amostras de amostras biológicas normais versus doenças, preferivelmente 50 ou mais amostras, antes da determinação do nível de expressão para a amostra em questão. O nível de expressão médio de cada um dos genes analisado no maior número de amostras é determinado e este é usado como uma linha de base do nível de expressão para o marcador. O nível de expressão do marcador determinado para a amostra de teste (nível absoluto de expressão) é depois dividido pelo valor médio de expressão obtido para este marcador. Isto fornece um nível de expressão relativo.

Preferivelmente, as amostras usadas na determinação da linha de base serão de pacientes que não possuem o polimorfismo. A escolha da fonte de células é dependente do uso de nível de expressão relativo. Usando a expressão encontrada nos tecidos normais como uma contagem média

de expressão ajuda na validação se o marcador for específico (versus células normais). Além disso, quanto mais dados for acumulado, o valor médio de expressão pode ser revisto, fornecendo valores de expressão relativos melhorados com base nos dados acumulados.

5 Polipectídeos de Expressão

Em uma outra modalidade da presente invenção, um polipeptídeo correspondente a um marcador é detectado. Um agente preferido para detectar um polipeptídeo da invenção é um anticorpo capaz de se ligar a um polipeptídeo que corresponde a um marcador da invenção, preferivelmente um anticorpo com um rótulo detectável. Os anticorpos podem ser policlonais, ou mais preferivelmente, monoclonais. Um anticorpo intacto, ou um fragmento deste (por exemplo, Fab ou F (ab')₂) pode ser usado. O termo "rotulado", com respeito à sonda ou anticorpo, é destinado a abranger a rotulação direta da sonda ou anticorpo por acoplamento (isto é, ligação física) de uma substância detectável à sonda ou anticorpo, assim como rotulação indireta da sonda ou anticorpo por reatividade com outro reagente que é diretamente rotulado. Exemplos de rotulação indireta incluem a detecção de um anticorpo primário usando um anticorpo secundário fluorescentemente rotulado e rotulação final de uma sonda de DNA com biotina tal que pode ser detectado com estreptavidina fluorescentemente rotulada.

As proteínas de pacientes com distúrbios psicóticos podem ser isoladas usando técnicas que são bem-conhecidas por aqueles versados na técnica. Os métodos de isolamento da proteína empregados podem, por exemplo, ser tais como aqueles descritos em Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1988).

Uma variedade de formatos podem ser empregados para se determinar se uma amostra contém uma proteína que se liga a um dado anticorpo. Exemplos de tais formatos incluem, mas não são limitados a eles, imunoensaio de enzima (EIA); radioimunoensaio (RIA), análise Western blot e análise imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA). Um versado pode facilmente adaptar os métodos conhecidos de detecção de proteína/anticorpo

para uso na determinação se as células expressão um marcador da presente invenção.

Em um formato, os anticorpos, ou fragmentos de anticorpos, podem ser usados nos métodos tais como Western blots ou técnicas de imunofluorescências para detectar as proteínas expressas. Em tais usos, é geralmente preferível imobilizar ou o anticorpo ou as proteínas sobre um suporte sólido. Os suportes ou veículos de fase sólida adequados incluem qualquer suporte capaz de se ligar a um antígeno ou um anticorpo. Os suportes ou veículos bem-conhecidos incluem vidro, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, náilon, amilases, celulosas naturais ou modificadas, poliacrilamidas, gabros e magnetita.

Uma pessoa versada na técnica conhecerá muitos outros veículos adequados para a ligação de anticorpo ou antígeno, e será capaz de adaptar tal suporte para uso com a presente invenção. Por exemplo, a proteína isolada de células do paciente pode ser manipulada em uma eletroforese em gel de poliacrilamida e imobilizada em um suporte de fase sólida tal com nitrocelulose. O suporte pode então ser lavado com tampões adequados seguido por tratamento com o anticorpo detectavelmente rotulado. O suporte de fase sólida pode então ser lavado com o tampão uma segunda vez para remover o anticorpo não ligado. A quantidade de rótulo ligado sobre o suporte sólido pode então ser detectada por meios convencionais.

A invenção também abrange kits par detectar a presença de um polipeptídeo ou ácido nucléico correspondente a um marcador da invenção em uma amostra biológica (por exemplo, qualquer fluido corporal incluindo mas não limitados a eles, soro, plasma, linfa, fluido cístico, urina, fezes, csf, fluido acítico ou sangue e incluindo amostras de biópsia de tecido corporal). Por exemplo, o kit pode compreender um composto rotulado ou agente capaz de detectar um polipeptídeo ou um mRNA que codifica um polipeptídeo que corresponde a um marcador da invenção em uma amostra biológica e meios para se determinar a quantidade do polipeptídeo ou mRNA na amostra (por exemplo, um anticorpo que se liga ao polipeptídeo ou uma sonda de oligonucleotídeo que se liga ao DNA ou mRNA que codifica o polipeptídeo).

Os kits podem também incluir instruções para interpretar os resultados obtidos usando o kit.

Para os kits com base em anticorpos, o kit pode compreender, por exemplo: 1) um primeiro anticorpo (por exemplo, ligado a um suporte sólido) que se liga a um polipeptídeo correspondente a um marcador da invenção; e, opcionalmente, 2) um segundo anticorpo diferente que se liga ou ao polipeptídeo ou ao primeiro anticorpo e é conjugado a um rótulo detectável.

Para os kits com base em oligonucleotídeo, o kit compreende, por exemplo: 1) um oligonucleotídeo, por exemplo, um oligonucleotídeo detectavelmente rotulado, que hibridiza em uma seqüência de ácido nucléico que codifica um polipeptídeo que corresponde a um marcador da invenção; ou 2) um par de iniciadores úteis para amplificar uma molécula de ácido nucléico correspondente a um marcador da invenção. O kit pode também compreender, por exemplo, um agente tampão, um conservante, ou um agente estabilizante da proteína. O kit pode ainda compreender componentes necessários para detectar o rótulo detectável (por exemplo, uma enzima ou um substrato). O kit pode também conter uma amostra de controle ou uma série de amostras de controle, que pode ser analisada e comparada à amostra de teste. Cada componente do kit pode ser fechado dentro de um recipiente individual e todos os vários recipientes podem estar dentro de uma embalagem única, juntamente com as instruções para interpretar os resultados das análises executadas usando o kit.

Introdução de Anticorpos Dentro das Células

A caracterização de proteínas intracelulares pode ser feita em uma variedade de métodos. Por exemplo, os anticorpos podem ser introduzidos dentro das células em muitas maneiras, incluindo, por exemplo, microinjeção de anticorpos dentro de uma célula (Morgan et al., 1988, *Immunology Today* 9: 84-86) ou transformar o mRNA do hibridoma que codifica um anticorpo desejado dentro de uma célula (Burke et al., 1984, *Cell* 36: 847-858). Em uma outra técnica, anticorpos recombinantes podem ser montados e ectopicamente expressos em uma ampla variedade de tipos de

célula não linfóides para se ligar à proteína alvo assim como às atividades da proteína alvo do bloco (Biocca et al., 1995, *Trends in Cell Biology* 5: 248-252). A expressão do anticorpo está preferivelmente sob o controle de um promotor, tal como o promotor Tet, ou um promotor de maneira constitutiva ativo (para produção de perturbações de saturação). Uma primeira etapa é a seleção de um anticorpo monoclonal particular com especificidade apropriada à proteína alvo (ver abaixo). Depois as seqüências que codificam as regiões variáveis do anticorpo selecionado podem ser clonadas em vários formatos de anticorpo montados, incluindo, por exemplo, o anticorpo inteiro, fragmentos Fab, fregmentos Fv, fragmentos Fv de cadeia única (regiões VH e VL unidas por um articulador de peptídeo) (fragmentos "ScFv"), diacorpos (dois fragmentos ScFv associados com especificidade diferente), e assim por diante (Hayden et al., 1997, *Current Opinion in Immunology* 9: 210-212). Os anticorpos intracelularmente expressos dos vários formatos podem ser direcionados dentro dos compartimentos celulares (por exemplo, o citoplasma, o núcleo, o mitocôndria, etc.) por expressá-los como fusões com as várias seqüências guias intracelulares conhecidas (Bradbury et al., 1995, *Antibody Engineering* (vol. 2) (Borrebaeck ed.), pp. 295-361, IRL Press). Em particular, o formato ScFv parece ser particularmente adequado para o direcionamento citoplásmico.

A Variedade de Tipos de Anticorpos Úteis

Os tipos de anticorpos incluem, mas não são limitados a eles, policlonais, monoclonais, quiméricos, de cadeia única, fragmentos Fab e uma biblioteca de expressão Fab. Vários procedimentos conhecidos na técnica podem ser úteis para a produção de anticorpos policlonais para uma proteína alvo. para a produção do anticorpo, vários animais hospedeiros podem ser imunizados por injeção com a proteína alvo, tais animais hospedeiros incluem, mas não são limitados a eles, coelhos, camundongos, ratos, etc. Vários adjuvantes podem ser usados para aumentar a resposta imunológica, dependendo da espécie de hospedeiro, e incluem, mas não são limitados a eles, de Freund (completa e incompleta), géis minerais tais como hidróxido de alumínio, substâncias tensoativas tais como lisolecitina, polióis plurôni-

cos, poliânions, peptídeos, emulsões oleosas, dinitrofenol, e adjuvantes humanos potencialmente úteis tais como os bacilos *Calmette-Guerin* (BCG) e *Corynebacterium parvum*.

Anticorpos Monoclonais

5 Para a preparação de anticorpos monoclonais direcionados rumo a uma proteína alvo, qualquer técnica que forneça a produção de moléculas de anticorpo por linhagens celulares contínuas em cultura pode ser usada. Tal técnica inclui, mas não são restritas a elas, a técnica de hibridoma originalmente desenvolvida por Kohler e Milstein (1975, *Nature* 256: 495-
10 497), a técnica de trioma, a técnica de hibridoma da célula B humana (Kozbor et al., 1983, *Immunology Today* 4: 72), e a técnica de hibridoma EBV para produzir anticorpos monoclonais humanos (Cole et al., 1985, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Em uma modalidade adicional da invenção, os anticorpos monoclonais podem
15 ser produzidos em animais livres de germes utilizando tecnologia recente (PCT/US90/02545). De acordo com a invenção, anticorpos humanos podem ser usados e podem ser obtidos mediante o uso de hibridomas humanos (Cote et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2026-2030), ou mediante a transformação de células B humanas com vírus EBV in vitro (Cole et al.,
20 1985, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). De fato, de acordo com a invenção, as técnicas desenvolvidas para a produção de "anticorpos quiméricos" (Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Sci. USA* 81: 6851-6855; Neuberger et al., 1984, *Nature* 312: 604-608; Takeda et al., 1985, *Nature* 314: 452-454) por junção dos genes de uma molécula de
25 anticorpo de camundongo específica para a proteína alvo juntamente com genes de uma molécula de anticorpo humano de atividade biológica apropriada podem ser usadas; tais anticorpos estão dentro do escopo desta invenção.

 Adicionalmente, onde os anticorpos monoclonais forem vantajosos, eles podem ser alternativamente selecionados de grandes bibliotecas
30 de anticorpos usando as técnicas de exposição fago (Marks et al., 1992, *J. Biol. Chem.* 267: 16007-16010). Usando esta técnica, as bibliotecas de até

10¹² anticorpos diferentes têm sido expressas sobre a superfície de fago filamentoso fd, criando um sistema imune in vitro "de um só pote" de anticorpos disponíveis para a seleção de anticorpos monoclonais (Griffiths et al., 1994, *EMBO J.* 13: 3245-3260). A seleção de anticorpos de tais livrarias

5 pode ser feita por técnicas conhecidas no ofício, incluindo o contato do fago com a proteína alvo imobilizada, selecionando e clonando a ligação fago ao alvo, e subclonando as seqüências que codificam as regiões variáveis do anticorpo em um vetor apropriado que expressa um formato de anticorpo desejado.

10 De acordo com a invenção, as técnicas descritas para a produção de anticorpos de cadeia única (Patente U.S. número 4.946.778) podem ser adaptadas para produzir anticorpos de cadeia única específicos para a proteína alvo. Uma modalidade adicional da invenção utiliza as técnicas descritas para a construção de bibliotecas de expressão Fab (Huse et al.,

15 1989, *Science* 246: 1275-1281) para permitir identificação rápida e fácil de fragmentos Fab monoclonais com a especificidade desejada para a proteína alvo.

Os fragmentos de anticorpo que contêm os idiótipos da proteína alvo podem ser gerados por técnicas conhecidas no ofício. Por exemplo, tais

20 fragmentos incluem, mas não são limitados a eles, o fragmento F(ab')₂ que pode ser produzido por digestão de pepsina da molécula de anticorpo; os fragmentos Fab' que podem ser gerados pela redução das pontes de dissulfeto do fragmento F(ab')₂, os fragmentos Fab que podem ser gerados pelo tratamento da molécula de anticorpo com papaína e um agente redutor,

25 e fragmentos Fv.

Na produção de anticorpos, a triagem para o anticorpo desejado pode ser realizada por técnicas conhecidas no ofício, por exemplo, ELISA (análise imunoabsorvente ligado a enzima). Para selecionar anticorpos específicos para uma proteína alvo, pode ser analisar os hibridomas gerados

30 ou uma biblioteca de anticorpos de exposição fago para um anticorpo que se liga à proteína alvo.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Alguns aspectos da presente invenção podem ser demonstrados por um exemplo que apresenta a maneira em que a correlação entre o polimorfismo no gene do CNTF e a resposta à medicação antipsicótica foi primeiro observada.

Em um esforço para identificar os fatores genéticos que podem se associar com a resposta de tratamento com loperidona, a conexão entre um polimorfismo no gene do CNTF (fator neurotrófico ciliar) (localizado no 11q12.2, o polimorfismo sendo 103 G>A na sequência do GenBank X55890 (Versão 1), ver PubMed: 9285965) e a resposta clínica à loperidona antipsicótica em um teste clínico foi investigada. Este teste foi escolhido a esmo, duplamente cego, controlado por placebo e risperidona, estudo de multicentro para avaliar a eficácia e segurança de duas faixas de dose não sobrepostas de loperidona (12 ou 16 mg/d e 20 ou 24 mg/d e risperidona (6 ou 8 mg/d) comparadas com placebo, dado diariamente duas vezes (b.i.d) por 42 dias para pacientes esquizofrênicos seguido por uma fase de tratamento a longo prazo com loperidona dada diariamente uma vez (q.d) em doses de 4, 8, 12, 16 ou 24 mg/d por 46 semanas aos pacientes com esquizofrenia.

A análise farmacogenética com relação a polimorfismos do gene candidato foi conduzida na Fase II do teste clínico. Foi determinado se o polimorfismo 103 G>A do CNTF (fator neurotrófico ciliar) (sequência do GenBank X55890 (Versão 1)) (alteração da proteína expressa FS63 TER) foi associado com qualquer um dos promotores clínicos de eficácia estudada no curso do teste clínico e especificamente mudanças nas escalas BPRSA, PANNS Total, PANNS Positivo, PANNS Negativo e PANNS Geral.

Uma associação significativa foi observada entre o polimorfismo no gene do CNTF e a resposta de tratamento (escalas BPRSA e PANNS Total) no grupo de tratamento de loperidona 12 a 16 mg. Para descrição da escala PANNS ver, Kay SR et al. 1987, *Schizophrenia Bulletin* 13;2: 261-276. Os indivíduos neste grupo que são do tipo GG do gene do CNTF responderam significativamente melhor do que o tipo não GG e a resposta do tipo GG versus o placebo é altamente significativo ($p < 0,001$). Estes resul-

tados mostram que as medicações antipsicóticas, tais como loperidona, possuem maior eficácia para o tratamento dos distúrbios psicóticos, tais como Esquizofrenia, entre os indivíduos do tipo GG do gene do CNTF. Desta maneira uma associação significativa entre o polimorfismo 103 G>A do CNTF (seqüência do GenBank X55890 (Versão 1)) e as escalas tanto BPRSA quanto PANNS Total foi identificada.

Um total de 207 amostras de sangue únicas foram coletadas dos pacientes nos locais de teste. O DNA foi extraído por Covance (Geneva) usando PUREGENE® DNA Isolation Kit (D-50K). O polimorfismo 103 G>A do CNTF (seqüência do GenBank X55890 (Versão 1)) foi descrito por Takahashi, ver Takahashi et al. *Nature Genet.* 7: 79-84, 1994.

As séries de sonda para a genotipação foram designadas e sintetizadas por Third Wave Technologies, Inc (Madison, WI). A genotipação foi executada em 60 ng de DNA genômico usando a análise INVADER® de acordo com as recomendações do fabricante (Third Wave Technologies, Inc, Madison WI), Ver Ryan D et al. *Molecular Diagnosis* Vol. 4 No 2 1999:135-144 e Lyamichev V et al. *Nature Biotechnology* Vol 17 1999:292-296, ver também as Patentes U.S. números 5.846.717 e 6.001.567 (cujas revelações são aqui incorporadas por referência em sua totalidade).

A análise envolveu uma análise do teste de variação dentro dos tratamentos para checar se qualquer um dos polimorfismos que foram genotipados foram significativamente associados com os parâmetros clínicos. O modelo consiste na mudança percentual nos parâmetros clínicos categorizados pelos genótipos. A associação entre o genótipo e os parâmetros clínicos, quando os tratamentos forem comparados com o placebo, é estabelecida usando análise de variação e análise de covariação.

Os termos na análise do modelo de variação incluem a mudança percentual nos parâmetros clínicos categorizados pelo tratamento de indivíduos com o mesmo genótipo. Os termos na análise do modelo de covariação incluem os valores de linha de base e valores finais dos parâmetros clínicos sob estudo categorizados por grupos de tratamento para indivíduos com o mesmo genótipo. A análise de variação dentro dos tratamentos reve-

lou que o PANSS Total e o BPRSA foram significativamente associados ($p < 0,001$) com o polimorfismo 103 G>A do CNTF sobre o CNTF para indivíduos tratados com dose de 12 a 16 mg de loperidona (Grupo A). O polimorfismo está presente sobre um íntron e resulta na modificação de um sítio junção, que por sua vez resulta em um mRNA truncado. O resultado destas modificações é uma resposta clínica variável.

Exemplo 2

Uma mulher de 30 anos de idade com novo ataque de um distúrbio psicótico é observada por um médico. Após diagnosticar um distúrbio psicótico que pode ser beneficiado por agentes antipsicóticos, seu médico informa ao paciente sobre a possibilidade de testá-lo com relação à presença do polimorfismo no gene do CNTF e explica que este resultado se destinaria quanto ao uso de medicação, incluindo loperidona.

Com a permissão do paciente, o médico executa um teste para determinar o genótipo do paciente e determina que o paciente possui a forma GG ou a forma AA do gene do CNTF na posição 103. O médico debate com o paciente as consequências a curto e a longo prazo do tratamento com medicação antipsicótica. O médico também debate as outras modalidades de tratamento e medicações disponíveis.

Na base destes resultados, o médico recomenda e o paciente concorda com um teste de uma medicação tal como loperidone para auxiliar o controle dos sintomas do distúrbio psicótico com a expectativa que o paciente apresentará uma resposta favorável em doses relativamente baixas com efeitos colaterais mínimos.

Exemplo 3

Um homem de 52 anos de idade, com um distúrbio psicótico é observado por seu médico com reclamações de efeitos colaterais antipsicóticos típicos tais como acatisia e discinésias. O paciente está sendo tratado com loperidona e seus sintomas psicóticos estão em bom controle mas ele experimenta numerosos efeitos colaterais da medicação. O médico recomenda a genotipação e aconselha o paciente a respeito do tratamento e as opções que os resultados da genotipação devem permitir. O paciente é tes-

- tado e determinado ter um dos genótipos, isto é, GG ou AA, associado com a resposta mais favorável à loperidona. Na base deste resultado e a sensibilidade elevada esperada à loperidona o médico é capaz de recomendar um regime de tratamento com uma dose substancialmente mais baixa de loperidona com probabilidade reduzida de efeitos colaterais. O médico é capaz de reduzir a dose de loperidona do paciente e reduzir os efeitos colaterais e melhorar a submissão do paciente sem arriscar a piora do distúrbio psicótico do paciente com possível perigo para o paciente e outros.

Glossário e Definições

- 10 O seguinte glossário e definições são fornecidas para facilitar o entendimento de certos termos usados freqüentemente neste relatório descritivo.

- Como aqui usado o termo "distúrbio psicótico" deve significar qualquer condição fisiológica patológica em que os sintomas psicóticos podem ocorrer ou ocorrem e inclui, mas não é limitado ao que segue: (também ver, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4ª edição (DSM-IV) Francis A editor, American Psychiatric Press, Wash, DC, 1994).

Distúrbios Esquizofrênicos

- Esquizofrenia, Catatônica, Subcrônica, (295.21),
- 20 Esquizofrenia, Catatônica, Crônica (295.22),
- Esquizofrenia, Catatônica, Subcrônica com Exacerbação Aguda (295.23),
- Esquizofrenia, Catatônica, Crônica com Exacerbação Aguda (295.24),
- Esquizofrenia, Catatônica, em Remissão (295.55),
- Esquizofrenia, Catatônica, Não especificada (295.20),
- 25 Esquizofrenia, Desorganizada, Subcrônica (295.11),
- Esquizofrenia, Desorganizada, Crônica (295.12),
- Esquizofrenia, Desorganizada, Subcrônica com Exacerbação Aguda (295.13),
- Esquizofrenia, Desorganizada, Crônica com Exacerbação Aguda (295.14),
- 30 Esquizofrenia, Desorganizada, em Remissão (295.15),
- Esquizofrenia, Desorganizada, Não especificada (295.10),
- Esquizofrenia, Paranóide, Subcrônica (295.31),

- Esquizofrenia, Paranóide, Crônica (295.32),
 Esquizofrenia, Paranóide, Subcrônica com Exacerbação Aguda (295.33),
 Esquizofrenia, Paranóide, Crônica com Exacerbação Aguda (295.34),
 Esquizofrenia, Paranóide, em Remissão (295.35),
- 5 Esquizofrenia, Paranóide, Não especificada (295.30),
 Esquizofrenia, Não diferenciada, Subcrônica (295.91),
 Esquizofrenia, Não diferenciada, Crônica (295.92),
 Esquizofrenia, Não diferenciada, Subcrônica com Exacerbação Aguda (295.93),
- 10 Esquizofrenia, Não diferenciada, Crônica com Exacerbação Aguda (295.94),
 Esquizofrenia, Não diferenciada, em Remissão (295.95),
 Esquizofrenia, Não diferenciada, Não especificada (295.90),
 Esquizofrenia, Residual, Subcrônica (295.61),
 Esquizofrenia, Residual, Crônica (295.62),
- 15 Esquizofrenia, Residual, Subcrônica com Exacerbação Aguda (295.63),
 Esquizofrenia, Residual, Crônica com Exacerbação Aguda (295.94),
 Esquizofrenia, Residual, em Remissão (295.65),
 Esquizofrenia, Residual, Não especificada (295.60),
 Distúrbio Delirante (Paranáide) (297.10),
- 20 Breve Psicose Reativa (298.80),
 Distúrbio Esquizofreniforme (295.40),
 Distúrbio Esquizoafetivo (295.70),
 Distúrbio Psicótico Induzido (297.30),
 Distúrbio Psicótico NOS (Psicose Atípica) (298.90)
- 25 Distúrbios Afetivos
 Distúrbio Depressivo Principal, Severo com Aspectos Psicóticos (296.33)
 Distúrbio Bipolar I, Episódio Maníaco Isolado, Severo com Aspectos Psicóticos (296.23)
 Distúrbio Bipolar I, Episódio Hipomaniaco Mais Recente (296.43)
- 30 Distúrbio Bipolar I, Episódio Maníaco Mais Recente, Severo com Aspectos Psicóticos (296.43)
 Distúrbio Bipolar I, Episódio Misturado Mais Recente, Severo com Aspectos

Psicóticos (296.63)

Distúrbio Bipolar I, Episódio Depressivo Mais Recente, Severo com Aspectos Psicóticos (296.53)

Distúrbio Bipolar I, Episódio Não especificado Mais Recente (296.89)

5 Distúrbio Bipolar II (296.89)

Distúrbio Ciclotímico (301.13)

Distúrbio Bipolar NOS (366)

Distúrbio do Humor Devido À (Condição Médica Geral) (293.83)

Distúrbio do Humor NOS (296.90)

10 Distúrbio de Conduta, Tipo Agressivo Solitário (312.00),

Distúrbio de Conduta, Tipo Não diferenciado (312.90),

Distúrbio de Tourette (307.23),

Distúrbio de Tique Motor Ou Vocal Crônico (307.22),

Distúrbio de Tique Transiente (307.21),

15 Distúrbio de Tique NOS (307. 20),

Distúrbios do Uso de Substância Psicoativa

Delírio de Abstinência de Álcool (291.00),

Alucnose Alcoólica (291.30),

Demencia Alcoólica Associada com Alcoolismo (291.20),

20 Intoxicação Simpatomimética de Anfetamina ou de Atuação Similar (305.70),

Delírio Simpatomimético de Anfetamina ou de Atuação Similar (292.81),

Distúrbio Delirante Simpatomimético de Anfetamina ou de Atuação Similar (292.11),

Distúrbio Delirante Por Cannabis (292.11),

25 Intoxicação por Cocaína (305.60),

Delírio por Cocaína (292.81),

Distúrbio Delirante por Cocaína (292.11),

Alucnose Alucinogênia (305.30),

Distúrbio Delirante Alucinogênio (292.11),

30 Distúrbio do Humor Alucinogênio (292.84),

Distúrbio da Percepção Pós Alucinógeno Alucinogênio (292.89),

Intoxicação de Arilcicloexilamina por Fenilciclídina (PCP) ou de Atuação Si-

- milar (305.90),
 Delírio de Arilcicloexilamina por Fenilciclídina (PCP) ou de Atuação Similar (292.81),
 Distúrbio Delirante de Arilcicloexilamina por Fenilciclídina (PCP) ou de Atuação Similar (292.11),
 5 Distúrbio do Humor de Arilcicloexilamina por Fenilciclídina (PCP) ou de Atuação Similar (292.84),
 Distúrbio Mental Orgânico de Arilcicloexilamina por Fenilciclídina (PCP) ou de Atuação Similar NOS (292.90),
 10 Intoxicação Por Outra Substância Psicoativa ou Não Especificada (305.90),
 Delírio Por Outra Substância Psicoativa ou Não Especificada (292.81),
 Demência Por Outra Substância Psicoativa ou Não Especificada (292.82),
 Distúrbio Delirante Por Outra Substância Psicoativa ou Não Especificada (292.11),
 15 Alucinação Por Outra Substância Psicoativa ou Não Especificada (292.12),
 Distúrbio do Humor Por Outra Substância Psicoativa ou Não Especificada (292.84),
 Distúrbio de Ansiedade Por Outra Substância Psicoativa ou Não Especificada (292.89),
 20 Distúrbio da Personalidade Por Outra Substância Psicoativa ou Não Especificada (292.89),
 Distúrbio Mental Orgânico Por Outra Substância Psicoativa ou Não Especificada NOS (292.90)
 Delírio (293.00),
 25 Demência (294.10),
 Distúrbio Obsessivo-Compulsivo (300.30),
 Distúrbio Explosivo Intermitente (312.34),
 Distúrbio de Controle de Impulso NOS (312.39)
Distúrbios de Personalidade
 30 Distúrbio de Personalidade, Paranóide (301.00),
 Distúrbio de Personalidade, Esquizóide (301.20),
 Distúrbio de Personalidade, Esquizotípica (301.22),

Distúrbio de Personalidade, Antissocial (301.70),

Distúrbio de Personalidade, Limitrofe (301.83)

O termo "agente antipsicótico" como aqui usado significa qualquer medicação usada para diminuir ou melhorar os sintomas de psicose em uma pessoa com um distúrbio psicótico e inclui, mas não é limitado aos seguintes compostos: Maleato de Acetofenazina; Bromidrato de Alentemol; Alpertina; Azaperona; Maleato de Batelapina; Benperidol; Cloridrato de Benzindopirina; Brofoxina; Bromperidol; Decanoato de Bromperidol; Cloridrato de Butaclamol; Butaperazina; Maleato de Butaperazina; Maleato de Carfenazina; Cloridrato de Carvotrolina; Clorpromazina; Cloridrato de Clorpromazina; Clorprotixeno; Cinpereno; Cintriamida; Fosfato de Clomacran; Clopentixol; Clopimozida; Mesilato de Clopipazan; Cloridrato de Cloroperona; Clotiapina; Maleato de Clotixamida; Clozapina; Cloridrato de Ciclofenazina; Droperidol; Cloridrato de Etazolato; Fenimida; Flucindol; Flumezapina; Decanoato de Flufenazina; Enantato de Flufenazina; Cloridrato de Flufenazina; Fluspiperona; Fluspirileno; Flutrolina; Cloridrato de Gevotrolina; Halopemide; Haloperidol; Decanoato de Haloperidol; Loperidona; Cloridrato de Imidolina; Lenperona; Succinato de Mazapertina; Mesoridazina; Besilato de Mesoridazina; Metiapina; Milenperona; Milipertina; Cloridrato de Molindona; Cloridrato de Naranol; Cloridrato de Neflumozida; Ocaperidona; Olanzapina; Oxiperomida; Penfluridol; Maleato de Pentiapina; Perfenazina; Pimozida; Cloridrato de Pinoxepina; Pipamperona; Piperacetazina; Palmitato de Pipotiazina; Cloridrato de Piquindona; Edisilato de Proclorperazina; Maleato de Proclorperazina; Cloridrato de Promazina; Quetiapina; Remoxiprida; Cloridrato de Remoxiprida; Risperidona; Cloridrato de Rincazol; Cloridrato de Seperidol; Seritindol; Setoperona; Espiperona; Tioridazina; Cloridrato de Tioridazina; Tiotixeno; Cloridrato de Tiotixeno; Cloridrato de Tioperidona; Cloridrato de Tiospirona; Cloridrato de Trifluoperazina; Trifluperidol; Triflupromazina; Cloridrato de Triflupromazina; e Cloridrato de Ziprasidona.

Além disso, o termo "agente antipsicótico" como aqui usado, inclui as assim chamadas medicações "antipsicóticas atípicas" incluindo, mas não são limitados a elas:

- Olanzapina, 2-metil-4-(4-metil-1-piperazinil)-10H-tieno[2,3 b][1,5]benzodiazepina, é um composto conhecido e é descrito na Patente U.S. número 5.229.382 como sendo útil para o tratamento de esquizofrenia, distúrbio esquizofreniforme, mania aguda, estados de ansiedade suaves, e psicose. A
- 5 Patente U.S. número 5.229.382 é aqui incorporada por referência em sua totalidade;
- Clozapina, 8-cloro-11-(4-metil-1-piperazinil)-5H-dibenzo[b,e][1,4] diazepina, é descrita na Patente U.S. número 3.539.573, que é aqui incorporada por referência em sua totalidade. A eficácia clínica no tratamento de esquizofre-
- 10 nia é descrita (Hanes, et al., Psychopharmacol. Bull., 24, 62 (1988));
- Risperidona, 3-[2-[4-(6-fluoro-1,2-benzisoxazol-3-ila)piperidino] etil]-2-metil-6,7,8,9-tetraidro-4H-pirido-[1,2-a]pirimidin-4-ona, e seu uso no tratamento de doenças psicóticas são descritos na Patente U.S. número 4.804.663, é aqui incorporada por referência em sua totalidade;
- 15 Sertindol, 1-[2-[4-[5-cloro-1-(4-fluorofenil)-1H-indol-3-ila]-1piperidinila]etila]imidazolidin-2-ona, é descrito na Patente U.S. número 4.710.500. Seu uso no tratamento de esquizofrenia é descrito nas Patentes U.S. números 5.112.838 e 5.238.945. As Patentes U.S. números 4.710.500; 5.112.838; e 5.238.945 são aqui incorporadas por referência em sua totalidade;
- 20 Quetiapina, 5-[2-(4-dibenzo[b,f][1,4]tiazepin-11-il-1-piperazinila)etóxi] etanol, e sua atividade nas análises que demonstra a utilidade no tratamento de esquizofrenia são descritos na Patente U.S. número 4.879.288, que é aqui incorporada por referência em sua totalidade. A Quetiapina é tipicamente administrada como seu sal de (E)-2-butenodioato (2:1); e;
- 25 Ziprasidona, 5-[2-[4-(1,2-benzoisotiazol-3-il)-1-piperazinil]etil]-6-cloro-1,3-diidro-2H-indol-2-ona, é tipicamente administrada como o monodrato de cloridrato. O composto é descrito nas Patentes U.S. números 4.831.031 e 5.312.925. Sua atividade nas análises que demonstram utilidade no tratamento de esquizofrenia é descrita na Patente U.S. número 4.831.031. As
- 30 Patentes U.S. números 4.831.031 e 5.312.925 são aqui incorporadas por referência em sua totalidade. Similarmente, quando a invenção é considerada em seu sentido mais amplo, o segundo composto do componente é um

composto que funciona como um inibidor da recaptação de serotonina.

"Nível significativo" como aqui usado, em referência ao nível de expressão de mRNA ou produto de polipeptídeo de um alelo particular (por exemplo, o polimorfismo no gene do CNTF (Localizado em 11q12.2), o polimorfismo sendo 103 G>A na sequência do GenBank X55890, ver PubMed: 9285965) significa que o nível de expressão que levaria uma pessoa versada na técnica a acreditar que o alelo em questão estava presente.

"Anticorpos" como aqui usado inclui anticorpos policlonais ou monoclonais, anticorpos quiméricos, de cadeia única e humanizados, assim como fragmentos Fab, incluindo os produtos de uma biblioteca de expressão Fab ou outra imunoglobulina.

"Polinucleotídeo" de uma forma geral se refere a qualquer polirribonucleotídeo (RNA) or polideoxirribonucleotídeo (DNA), que pode ser RNA ou DNA não modificado ou modificado. Os "polinucleotídeos" incluem, sem limitação DNA de filamento único e duplo, DNA que é uma mistura de regiões de filamento único e duplo, RNA de filamento único e duplo, e RNA que é uma mistura de regiões de filamento único e duplo, moléculas híbridas compreendendo DNA e RNA que podem ser de filamento único ou, mais tipicamente, de filamento duplo ou uma mistura de regiões de filamento único e duplo. Além disso, "polinucleotídeo" se refere às regiões de filamento triplo compreendendo RNA ou DNA ou tanto RNA quanto DNA. O termo "polinucleotídeo" também inclui DNAs ou RNAs contendo uma ou mais bases modificadas e DNAs ou RNAs com cadeias principais modificadas para estabilidade ou por outras razões.

Bases "modificadas" incluem, por exemplo, bases tritiladas e bases não usuais tais como inosina. Uma variedade de modificações podem ser feitas ao DNA e RNA; assim, "polinucleotídeo" abrange formas química, enzimática ou metabolicamente modificadas de polinucleotídeos como tipicamente encontrados na natureza, assim como as formas químicas de DNA e RNA característicos de vírus e células. "Polinucleotídeo" também abrange polinucleotídeos relativamente curtos, freqüentemente referidos como oligonucleotídeos.

"Polipeptídeo" se refere a qualquer polipeptídeo que compreende dois ou mais aminoácidos unidos entre si por ligações de peptídeo ou ligações de peptídeo modificado, isto é, isósteros de peptídeo. "Polipeptídeo" se refere tanto a cadeias curtas, comumente referidas como peptídeos, oligopeptídeos ou oligômeros, quanto a cadeias mais longas, geralmente referidas como proteínas. Os polipeptídeos podem conter aminoácidos diferentes dos aminoácidos codificados pelo gene 20. Os "Polipeptídeos" incluem seqüências de aminoácido modificadas ou por processos naturais, tais como processamento pós-translacional, ou por técnicas de modificação química que são bem-conhecidas na técnica. Tais modificações são bem descritas nos textos básicos e em monografias mais detalhadas, assim como em uma literatura de pesquisa volumosa. As modificações podem ocorrer em qualquer lugar em um polipeptídeo, incluindo a cadeia principal de peptídeo, as cadeias laterais de aminoácido e os terminais de amino ou carboxila.

Será observado que o mesmo tipo de modificação pode estar presente em graus idênticos ou variáveis em alguns sítios em um dado polipeptídeo. Também, um dado polipeptídeo pode conter muitos tipos de modificações. Os polipeptídeos podem ser ramificados como um resultado da ubiquitinação, e eles podem ser cíclicos, com ou sem ramificação. Os polipeptídeos cíclicos, ramificados e cíclicos ramificados podem resultar de processos naturais de pós-translação ou podem ser produzidos por métodos sintéticos. As modificações incluem acetilação, acilação, ribosilação por ADP, amidação, biotinilação, ligação covalente de flavina, ligação covalente de uma porção heme, ligação covalente de um nucleotídeo ou derivado de nucleotídeo, ligação covalente de um lipídeo ou derivado de lipídeo, ligação covalente de fosfatidilinositol, reticulação, ciclização, formação de ligação de dissulfeto, desmetilação, formação de reticulações covalentes, formação de cistina, formação de piroglutamato, formilação, gama-carboxilação, glicosilação, formação de âncora de GPI, hidroxilação, iodação, metilação, miristoilação, oxidação, processamento proteolítico, fosforilação, prenilação, raceminação, selenoilação, sulfação, adição mediada por transferência de RNA

de aminoácidos às proteínas tais como arginilação, e ubiquitinação (ver, por exemplo, *Proteins - Structure and Molecular Properties*, 2ª Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993; Wold, F., *Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects*, 1-12, em

5 *Post-translational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983; Seifter et al, "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", *Meth Enzymol*, 182, 626-646, 1990, e Rattan et al., "Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging", *Ann NY Acad Sci*, 663, 48-62, 1992).

10 "Fragmento" de uma seqüência de polipeptídeo se refere a uma seqüência de polipeptídeo que é mais curta do que a seqüência de referência mas que retém essencialmente a mesma função ou atividade biológica como o polipeptídeo de referência.

"Variante" se refere a um polinucleotídeo ou polipeptídeo que

15 difere de um polinucleotídeo ou polipeptídeo de referência, mas retém as suas propriedades essenciais. Uma variante típica de um polinucleotídeo difere da seqüência de nucleotídeo do polinucleotídeo de referência. As mudanças na seqüência de nucleotídeo da variante podem ou não podem alterar a seqüência de aminoácido de um polipeptídeo codificado pelo polinu-

20 cleotídeo de referência. As mudanças de nucleotídeo podem resultar em substituições, adições, anulações, fusões e truncações de aminoácido no polipeptídeo codificado pela seqüência de referência, como debatido abaixo. Uma variante típica de um polipeptídeo difere na seqüência de aminoácido do polipeptídeo de referência. Geralmente, as alterações são limitadas de

25 modo que as seqüências do polipeptídeo de referência e da variante são no total exatamente similares e, em muitas regiões idênticas. Uma variante e polipeptídeo de referência podem diferir na seqüência de aminoácido por uma ou mais substituições, inserções, deleções em qualquer combinação. Um resíduo de aminoácido substituído ou inserido pode ou não pode ser um

30 codificado pelo código genético. As substituições conservadoras típicas incluem Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln-I Ser, Thr; Lys, Arg; e Phe e Tyr. Uma variante de um polinucleotídeo ou polipeptídeo pode ser de ocor-

rência natural tal como um alelo, ou pode ser uma variante que não é conhecida de ocorrer naturalmente. As variantes de ocorrência não natural de polinucleotídeos e polipeptídeos podem ser produzidas por técnicas de mutagênese ou por síntese direta. Também incluídas como variantes são os polipeptídeos tendo uma ou mais modificações translacionais, por exemplo, glicosilação, fosforilação, metilação, ribosilação ADP e outras mais. As modalidades incluem metilação do aminoácido N-terminal, fosforilações de serinas e treoninas e modificação de glicinas C-terminais.

"Polimorfismo" - A variação de seqüência observada em um indivíduo em um sítio polimórfico. Os polimorfismos incluem substituições, inserções, deleções e microssatélites de nucleotídeo e podem, mas não necessitam, resultar em diferenças detectáveis na expressão do gene ou função da proteína.

"Sítio polimórfico (PS)" - Uma posição dentro de um lugar em que pelo menos duas seqüências alternativas são encontradas em uma população, a mais freqüente das quais possui uma freqüência de não mais do que 99 %.

"Variante polimórfica" - Um gene, mRNA, cDNA, polipeptídeo ou peptídeo cujo nucleotídeo ou seqüência de aminoácido varia a partir de uma seqüência de referência devido à presença de um polimorfismo no gene.

"Dados de polimorfismo" - Informação a respeito de um ou mais dos que seguem com relação a um gene específico: localização de sítios polimórficos; variação de seqüência nestes sítios; freqüência de polimorfismos em uma ou mais populações; os genótipos e/ou haplótipos diferentes determinados para o gene; freqüência de um ou mais destes genótipos e/ou haplótipos em uma ou mais populações; qualquer associação conhecida entre um traço e um genótipo ou um haplótipo com o gene.

"Base de dados de polimorfismo" - Uma coleção de dados de polimorfismo combinada em uma maneira sistemática ou metódica e capaz de ser individualmente acessada por meio eletrônico ou outros meios.

"Polimorfismo de Nucleotídeo Único" (SNP) se refere à ocorrência de variabilidade de nucleotídeo em uma posição de nucleotídeo única no

genoma, dentro de uma população. Um SNP pode ocorrer dentro de um gene ou dentro de regiões intergênicas do genoma. Os SNPs podem ser analisados usando Amplificação Específica do Alelo (ASA). Para o processo pelo menos 3 iniciadores são requeridos. Um iniciador comum é usado em complemento inverso ao polimorfismo sendo analisado. Este iniciador comum pode estar entre 50 e 1500 bps da base polimórfica. Os outros dois (ou mais) iniciadores são idênticos um ao outro exceto que a base 3' final oscila para emparelhar um dos dois (ou mais) alelos que compõem o polimorfismo. Duas (ou mais) reações PCR são depois conduzidas sobre o DNA de amostra, cada uma usando o iniciador comum e um dos Iniciadores Específicos do Alelo.

"Variante de Junção" como aqui usada se refere às moléculas de cDNA produzidas a partir de moléculas de RNA inicialmente transcritas da mesma seqüência de DNA genômico mas que possuem junção de RNA alternativo suportada. A junção de RNA alternativo ocorre quando um RNA primário transcrito sofre junção, geralmente para a remoção de íntrons, que resulta na produção de mais do que uma molécula de mRNA, cada uma das quais codifica diferentes seqüências de aminoácido. O termo variante de junção também se refere às proteínas codificadas pelas moléculas de cDNA acima.

"Identidade" reflete uma conexão entre duas ou mais seqüências de polipeptídeo ou duas ou mais seqüências de polinucleotídeo, determinadas mediante a comparação das seqüências. Em geral, identidade se refere a um nucleotídeo exato para nucleotídeo ou aminoácido para correspondência de aminoácido das duas seqüências de polinucleotídeo ou duas seqüências de polipeptídeo, respectivamente, sobre o comprimento das seqüências sendo comparadas.

"Homólogo" é um termo genérico usado na técnica para indicar uma seqüência de polinucleotídeo ou polipeptídeo que possui um grau elevado de seqüência ligada a uma seqüência de referência. Tal ligação pode ser quantificada mediante a determinação do grau de identidade e/ou similaridade entre as duas seqüências como mais acima definido. Caindo dentro

deste termo genérico são os termos "ortólogo" e "parólogo". "Ortólogo" se refere a um polinucleotídeo ou polipeptídeo que é o equivalente funcional do polinucleotídeo ou polipeptídeo em uma outra espécie. "Parólogo" se refere a um polinucleotídeo ou polipeptídeo que está dentro da mesma espécie que é funcionalmente similar.

"Proteína de fusão" se refere a uma proteína codificada por dois, não relacionados, genes fundidos ou fragmentos destes. Exemplos foram apresentados nas Patentes U.S. números 5.541.087 e 5.726.044 (ambas das quais são aqui incorporadas por referência para todos os propósitos).

No caso de Fc-PGPCR-3, que emprega uma região Fc de imunoglobulina como uma parte de uma proteína de fusão é vantajoso para executar a expressão funcional de Fc-PGPCR-3 ou fragmentos de PGPCR-3, para melhorar as propriedades farmacocinéticas de uma tal proteína de fusão quando usados para terapia e para gerar um Fc-PGPCR-3 dimérico. O constructo de Fc- PGPCR-3 DNA compreende na direção de 5' a 3', a cassete de secreção, isto é, uma seqüência de sinal que dispara a exportação de uma célula de mamífero, DNA que codifica um fragmento da região Fc de imunoglobulina, como um co-participante de fusão, e um DNA que codifica Fc-PGPCR-3 ou seus fragmentos. Em algumas utilizações seria desejável ser capaz de alterar as propriedades funcionais intrínsecas (ligação de complemento, ligação de Fc-Receptor) mediante a mutação dos lados funcionais de Fc enquanto se deixa o resto da proteína de fusão intocado ou anular a parte Fc completamente após a expressão.

"Alelo" - Uma forma particular de um lugar genético, distinguido das outras por sua seqüência de nucleotídeo particular.

"Gene candidato" - Um gene que é hipotético de ser responsável por uma doença, condição, ou a resposta a um tratamento, ou de ser correlacionado com um destes.

"Gene" - Um segmento de DNA que contém toda a informação para a biossíntese regulada de um produto de RNA, incluindo promotores, exons, introns, e outras regiões não transladas que a expressão controla.

"Genótipo" - Uma seqüência de 5' a 3' não submetida a fase de

par(es) de nucleotídeo observada em um ou mais sítios polimórficos em um lugar em um par de cromossomas homólogos em um indivíduo. Como aqui usado, o genótipo inclui um genótipo completo e/ou um subgenótipo como descrito abaixo.

5 "Genótipo completo" - A seqüência de 5' a 3' não submetida a fase de pares de nucleotídeo observada em todos os sítios polimórficos conhecidos em um lugar em um par de cromossomas homólogos em um indivíduo isolado.

10 "Sub-genótipo" - A seqüência de 5' a 3' não submetida a fase de nucleotídeos observados em uma subsérie dos sítios polimórficos conhecidos em um lugar em um par de cromossomas homólogos em um indivíduo isolado.

"Genotipação" - Um processo para se determinar um genótipo de um indivíduo.

15 "Haplótipo" - Uma seqüência de 5' a 3' de nucleotídeos observados em um ou mais sítios polimórficos em um lugar em um cromossoma único de um indivíduo isolado. Como aqui usado, o haplótipo inclui um haplótipo completo e/ou um sub-haplótipo como descrito abaixo.

20 "Haplótipo completo" - A seqüência de 5' a 3' de nucleotídeos observados em todos os sítios polimórficos conhecidos em um lugar em um cromossoma único de um indivíduo isolado.

"Sub-haplótipo" - A seqüência de 5' a 3' de nucleotídeos observados em uma sub-série dos sítios polimórficos conhecidos em um lugar em um cromossoma único de um indivíduo isolado.

25 "Par de haplótipo" - Os dois haplótipos observados para um lugar em um indivíduo isolado.

"Haplotipação" - Um processo para se determinar um ou mais haplótipos em um indivíduo e inclui o uso de linhagens de família, técnicas moleculares e/ou inferência estatística.

30 "Dados de haplótipo" - Informação que diz respeito a um ou mais dos que segue com relação a um gene específico: uma listagem dos pares de haplótipo em cada indivíduo em uma população; uma listagem dos

haplótipos diferentes em uma população; frequência de cada haplótipo nesta ou outras populações, e quaisquer associações conhecidas entre um ou mais haplótipos e um traço.

5 "Isoforma" - Uma forma particular de um gene, mRNA, cDNA ou a proteína codificada desse modo, distinguida das outras formas por sua seqüência particular e/ou estrutura.

 "Isogênese" - Uma das isoformas de um gene observada em uma população. Um isogênese contém todos os polimorfismos presentes na isoforma particular do gene.

10 "Isolado" - Como aplicado a uma molécula biológica tal como RNA, DNA, oligonucleotídeo, ou proteína, isolado significa que a molécula é substancialmente livre de outras moléculas biológicas tais como ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos, carboidratos, ou outro material tal como fragmentos celulares e meio de crescimento. Geralmente, o termo "isolado" não
15 é destinado a se referir a uma ausência completa de tal material ou a ausência de água, tampões, ou sais, a não ser que eles estejam presentes em quantidades que substancialmente interferem com os métodos da presente invenção.

 "Ligação" - descreve a tendência dos genes de serem hereditários juntos como um resultado de sua localização no mesmo cromossoma; medido por recombinação percentual entre lugares.

 "Desequilíbrio de ligação" - descreve uma situação em que algumas combinações de marcadores genéticos ocorrem mais ou menos frequentemente na população que seria esperada de sua distância ao lado.
25 Implica que um grupo de marcadores foi herdado coordenadamente. Pode resultar da recombinação reduzida na região ou de um efeito iniciador, em que houve tempo insuficiente para alcançar equilíbrio visto que um dos marcadores foi introduzido na população.

 "Lugar" - Uma localização em um cromossoma ou molécula de
30 DNA correspondente a um gene ou um aspecto físico ou fenotípico.

 "Ocorrência natural" - Um termo usado para designar que o objeto é aplicado, por exemplo, polinucleotídeo ou polipeptídeo de ocorrência

natural, pode ser isolado de uma fonte na natureza e que não foi intencionalmente modificado pelo homem.

"Par de nucleotídeo" - Os nucleotídeos observados em um sítio polimórfico nas duas cópias de um cromossoma de um indivíduo.

5 "Submetido a fase" - Quando aplicado a uma seqüência de pares de nucleotídeo por dois ou mais sítios polimórficos em um lugar, submetido a fase significa a combinação de nucleotídeos presentes naqueles sítios polimórficos em uma cópia única do lugar conhecido.

10 "Não submetido a fase" - Quando aplicado a uma seqüência de pares de nucleotídeo por dois ou mais sítios polimórficos em um lugar, não submetido a fase significa a combinação de nucleotídeos presentes naqueles sítios polimórficos em uma cópia única do lugar não conhecido.

15 "Grupo de população" - Um grupo de indivíduos que compartilham uma característica comum tal como origem etnogeográfica, condição médica, resposta ao tratamento etc.

"População de referência" - Um grupo de pacientes ou indivíduos que são prognosticados serem representantes de 1 ou mais características do grupo de população. Tipicamente, a população de referência representa a variação genética na população em um nível de certeza de pelo menos 85 %, preferivelmente pelo menos 90 %, mais preferivelmente pelo menos 95 % e ainda mais preferivelmente pelo menos 99 %.

"Paciente" - Um indivíduo humano cujos genótipos ou haplótipos ou resposta ao tratamento ou estado doentio devem ser determinados.

25 "Tratamento" - Um estímulo administrado interna ou externamente a um paciente.

Referências Citadas

30 Todas as referências aqui citadas são incorporadas aqui como referência em sua totalidade e para todos os propósitos na mesma amplitude como se cada publicação individual ou patente ou pedido de patente fosse específica e individualmente indicado a ser incorporado por referência em sua totalidade para todos os propósitos. O debate de referências aqui é destinado simplesmente para sumarizar as afirmações feitas por seus auto-

res e nenhuma admissão é feita de modo que qualquer referência constitua a técnica anterior. Os requerentes reservam o direito à objeção da exatidão e pertinência das referências citadas.

5 Além disso, todos os números de acesso ao GenBank, números de Unigene Cluster e números de acesso da proteína aqui citados são incorporados aqui por referência em sua totalidade e para todos os propósitos na mesma amplitude como se cada um de tais números fosse específica e individualmente indicado a ser incorporado por referência em sua totalidade para todos os propósitos.

10 A presente invenção não deve ser limitada em termos das modalidades particulares descritas neste pedido, que são destinadas como ilustrações isoladas dos aspectos individuais da invenção. Muitas modificações e variações desta invenção podem ser feita sem divergir de seu espírito e escopo, como será evidente para aqueles versados na técnica. Os métodos e mecanismos funcionalmente equivalentes dentro do escopo da invenção, além daqueles aqui enumerados, serão evidentes para aqueles versados na técnica a partir da descrição precedente e desenhos que acompanham. Tais modificações e variações são destinadas a cair dentro do escopo das reivindicações anexas. A presente invenção deve ser limitada somente pelos termos das reivindicações anexas, juntamente com o escopo completo de equivalentes a qual tais reivindicações são denominadas.

15

20

REIVINDICAÇÕES

1. Método para determinar a responsividade de um indivíduo com um distúrbio psicótico ao tratamento com loperidona, caracterizado pelo fato de que compreende:

- 5 (a) determinar para as duas cópias do gene do CNTF presentes no indivíduo, a identidade de um par de nucleotídeos em um sítio polimórfico na região do gene do CNTF que está em desequilíbrio de ligação com o sítio polimórfico no CNTF 103 G>A na referência da sequência do GenBank No. X55890 (Versão 1); e
- 10 (b) indicar o indivíduo a um bom grupo de respondedores se o par de nucleotídeos em um sítio polimórfico na região do gene do CNTF que está em desequilíbrio de ligação com o sítio polimórfico em 103 G>A indicar que, no sítio polimórfico do CNTF em 103 G>A, ambos os pares de nucleotídeo são GC ou ambos os pares são AT e em um grupo respondedor inferior
- 15 se dito par de nucleotídeos indicar que um par é AT e um par é GC no sítio do CNTF 103 G>A.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa de determinação (a) compreende ainda o uso de um kit para identificação de um padrão de polimorfismo de um paciente no sítio

20 polimórfico do CNTF 103 G>A, o dito kit compreendendo meios para determinar um padrão de polimorfismo genético no sítio polimórfico do CNTF 103 G>A.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o kit compreende ainda meios de coleta de amostra de DNA.

25 4. Método de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que os meios para determinar um padrão de polimorfismo genético no sítio polimórfico do CNTF 103 G>A compreende pelo menos um oligonucleotídeo(s) de determinação do genótipo do CNTF.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo

30 fato de que os meios para determinar um padrão de polimorfismo genético no sítio polimórfico do CNTF 103 G>A compreende pelo menos dois oligonucleotídeos de determinação do genótipo do CNTF.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 5, caracterizado pelo fato de que os meios para determinar um padrão de polimorfismo genético no sítio polimórfico do CNTF 103 G>A compreende pelo menos uma composição iniciadora de determinação do genótipo do CNTF compreendendo pelo menos um oligonucleotídeo de determinação do genótipo do CNTF.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a composição iniciadora de determinação do genótipo do CNTF compreende pelo menos duas séries de pares iniciadores específicos do alelo.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 7, caracterizado pelo fato de que os dois oligonucleotídeos de determinação do genótipo do CNTF são embalados em recipientes separados.

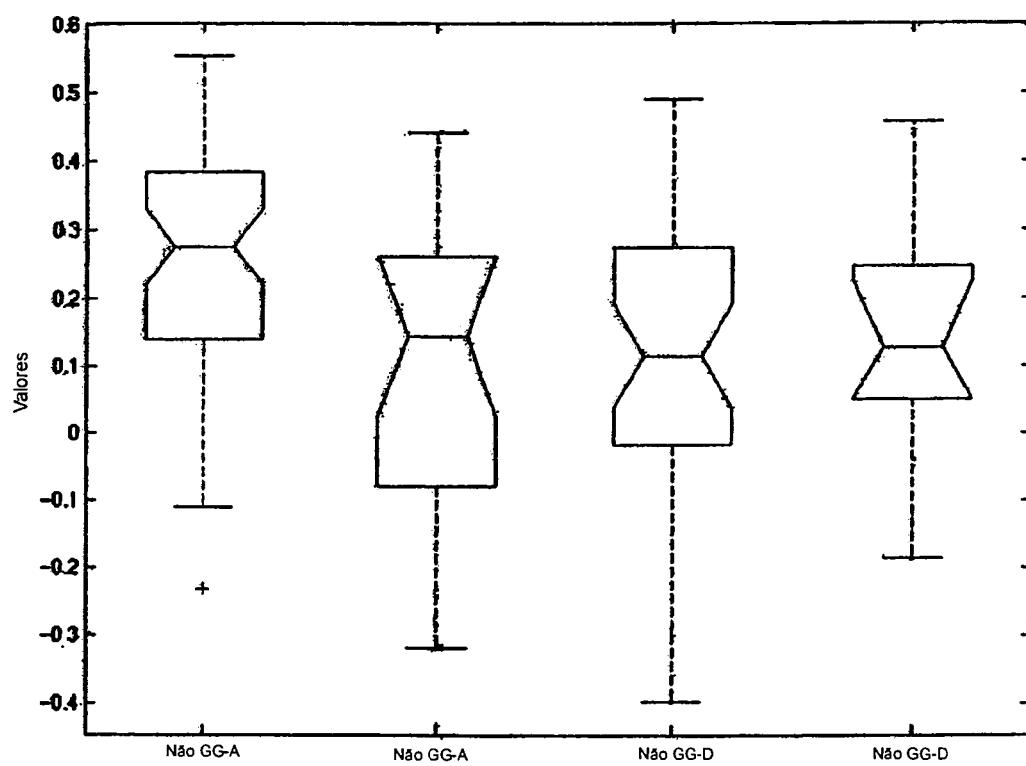


FIG. 1

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODO PARA DETERMINAR A RESPONSABILIDADE DE INDIVÍDUO COM DISTÚRBIO PSICÓTICO AO TRATAMENTO COM LOPERIDONA".**

5 A presente invenção refere-se ao método para determinar a responsividade de um indivíduo com um distúrbio psicótico ao tratamento com loperidona, o qual compreende: (a) determinar para as duas cópias do gene do CNTF presentes no indivíduo, a identidade de um par de nucleotídeos em um sítio polimórfico na região do gene do CNTF que está em desequilíbrio
10 de ligação com o sítio polimórfico no CNTF 103 G>A na referência da sequência do GenBank No. X55890 (Versão 1) e (b) indicar o indivíduo a um bom grupo de respondedores se o par de nucleotídeos em um sítio polimórfico na região do gene do CNTF que está em desequilíbrio de ligação com o sítio polimórfico em 103 G>A indicar que, no sítio polimórfico do CNTF em
15 103 G>A, ambos os pares de nucleotídeo são GC ou ambos os pares são AT e em um grupo respondedor inferior se dito par de nucleotídeos indicar que um par é AT e um par é GC no sítio do CNTF 103 G>A.