

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0620914-9 A2**

(22) Data de Depósito: 28/12/2006
(43) Data da Publicação: 29/11/2011
(RPI 2134)



(51) *Int.Cl.:*
C12Q 1/68
G01N 33/566

(54) **Título:** MARCADORES E MÉTODOS PARA AVALIAR E TRATAR PSORÍASE E DISTÚRBIOS RELACIONADOS

(30) **Prioridade Unionista:** 28/12/2005 US 60/754,243

(73) **Titular(es):** Centocor, INC.

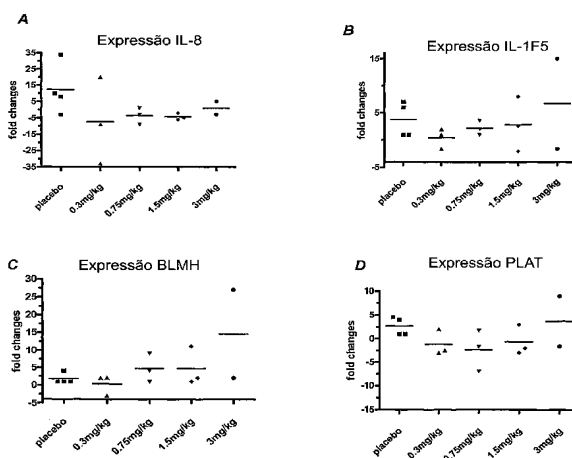
(72) **Inventor(es):** Bernard Amegadzie, Chong Huang, Guihua Liu, Jacqueline Benson, Xilin Li

(74) **Procurador(es):** Dannemann ,Siemens, Bigler & Ipanema Moreira

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2006062670 de 28/12/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/076523de 05/07/2007

(57) **Resumo:** MARCADORES E MÉTODOS PARA AVALIAR E TRATAR PSORÍASE E DISTÚRBIOS RELACIONADOS. A presente invenção refere-se a um método para avaliação prognóstica ou diagnóstica de um distúrbio relacionado à pele, tal como psoríase, em um indivíduo, que correlaciona a presença, ausência, e/ou magnitude de um gene em uma amostra com um padrão de referência para determinar a presença e/ou gravidade do distúrbio, e/ou a resposta a tratamento do distúrbio. O método facilita identificação da eficácia de terapias candidatas.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MARCADORES E MÉTODOS PARA AVALIAR E TRATAR PSORÍASE E DISTÚRBIOS RELACIONADOS"**.

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se à identificação de perfis de expressão e os ácidos nucleicos indicativos de distúrbios relacionados à pele, tal como psoríase ativa, e ao uso de tais perfis de expressão e ácidos nucleicos na diagnose de psoríase e doenças correlatas. A invenção adicionalmente refere-se a métodos para identificação e uso de agentes candidatos e/ou alvos que
10 modulam psoríase.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Psoríase vulgar é uma doença crônica inflamatória da pele, com uma patofisiologia subjacente extremamente complexa. Os componentes celulares incluem queratinócitos epidérmicos hiperplásicos, células mononucleares infiltrantes, incluindo células T, neutrófilos, células dendríticas, e macrófagos (Barker, JN. 1994. *Baillieres Clin. Rheumatol.* 8:429-). Essas células mediadoras de doença exibem produção anormal de diversas famílias de proteínas, tais como citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, inibidores de proteases e proteinase. A função dessas proteínas varia de imunidade inata e inflamação para diferenciação e proliferação celular (Barker, J. e outros, 1991. *J. Dermatol. Sci.*, 2: 106- ; Austin, LM 1999. *J. Invest Dermatol.* 113: 752-). Por meio de estudos clínicos e translacionais, têm sido mostrado que pelo menos algumas dessas moléculas desempenham papéis críticos no desenvolvimento e manutenção de psoríase.

25 Duas citocinas que se pensam ser importantes no desenvolvimento de respostas imunes de Th1 em psoríase são interleucina-12 (IL-12) e IL-23. Ambas citocinas são produzidas por células que exibem antígeno, tais como macrófagos e células dendríticas, e funcionam ativando células T e células assassinas naturais. IL-12 e IL-23 são membros de uma família
30 heterodimérica de citocinas solúveis que são compreendidas de subunidades protéicas p35/p40 em IL-12 e subunidades protéicas p19/p40 em IL-23. A subunidade p40 de IL-12 de cada citocina ligar-se-á ao receptor beta 1 de

transmembrana IL-12 (IL-12R1) que é encontrado na superfície de células imunes.

Ligação subsequente de p35 de IL-12 ou p19 de IL-23 a seus parceiros de receptores, IL-12R2 e IL-23R, respectivamente, resulta em eventos de sinalização imune que são específicos para cada citocina. Desse modo, interrupção da interação de p40 de IL-12/IL-12R1 impede a atividade biológica tanto de IL-12 quanto de IL-23. As funções de IL-12 são bem caracterizadas e incluem indução de interferon-(IFN-), diferenciação de células Th1, e ligação em ponte entre resistência inata e imunidade adaptativa (Trinchieri, G. 2003 Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 133146). Embora muitas das consequências imunes de IL-23 sejam ainda o objetivo de pesquisa ativa, IL-23 foi proposto apresentar funções que são similares, mas não idênticas, às daquelas de IL-12 (Oppmann e outros, 2000 *Immunity* 13: 715 725).

Tecnologia de microensaio é uma ferramenta poderosa uma vez que permite análise da expressão de milhares de genes simultaneamente e pode também ser automatizada permitindo um formato de alto desempenho. Em doenças associadas a funções complexas de hospedeiro tais como essas doenças conhecidas como auto-imunes, tal como psoríase, resultados de microensaios podem proporcionar uma perfil de expressão gênica que pode ser de utilidade no planejamento de novas abordagens para diagnose e controle de doenças. Essas abordagens também servem para identificar novos genes e anotar genes de função desconhecida até agora não-associada à doença ou condição.

Expressão gênica pode ser modulada em diversos diferentes modos, incluindo através do uso de siRNAs, shRNAs, moléculas antissentidos e DNazimas. SiRNAs e shRNAs ambos funcionam via o caminho RNAi e foi com bom êxito usado para suprimir a expressão de genes. RNAi foi primeiro descoberto em vermes e o fenômeno de silenciamento genético relacionado a dsRNA foi primeiro registrado em plantas por Fire e Mello e pensa-se ser um meio de células vegetais combater infecção com vírus RNA. Nesse caminho, o produto viral longo dsRNA é processado em pequenos

fragmentos de 21-25 bp de comprimento por uma enzima tal como DICER e em seguida a molécula de dupla-fita é desatada e carregada para o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). Um caminho similar foi identificado em células de mamíferos com a notável diferença que as moléculas de dsRNA têm de ser menores que 30 bp de comprimento a fim de evitar a indução da resposta chamada interferon, que não é específica a gene e leva à paralisação de síntese protéica na célula.

SiRNAs sintéticos foram com bom êxito projetados para seletivamente direcionar um único gene e podem ser transferidos para células *in vitro* ou *in vivo*. ShRNAs são os DNA equivalentes de moléculas de siRNA e apresentam a vantagem de ser incorporado em um genoma da célula onde eles replicados durante todo o ciclo mitótico.

DNAzimas são também usadas para modular expressão genética. DNAzimas são moléculas de DNA catalíticas que clivam RNA monofita. Elas são altamente seletivas em relação a sequência-alvo de RNA e como tais podem ser usadas para inibir (down-regulate) genes específicos por meio de direcionamento do RNA mensageiro.

Consequentemente, há uma necessidade de identificar e caracterizar novos marcadores genéticos úteis no desenvolvimento de métodos de diagnosticar e tratar distúrbios auto-imunes, tal como psoríase, bem como outras doenças e condições.

Sumário da Invenção

A presente invenção refere-se a um método de diagnosticar e/ou tratar psoríase e/ou doenças ou distúrbios correlatos por meio de identificação e utilização de agentes candidatos e/ou alvos que modulam tais doenças ou distúrbios. A presente invenção inclui a descoberta de um painel de 36 genes que apresentam níveis de expressão modificada em pacientes com psoríase e/ou tratados com um agente eficaz na redução dos sintomas de psoríase. Os níveis de expressão modificada constituem um perfil que pode funcionar como um perfil de biomarcador indicativo de psoríase e/ou a resposta de um indivíduo a tratamento.

Em uma modalidade particular, a presente invenção compreende

um método de determinação da eficácia do tratamento de psoríase baseado no padrão de expressão genética de um ou mais dos 36 genes que constituem o perfil. Isso pode ser realizado por um indivíduo, por exemplo, antes da manifestação de outras medições totais de resposta clínica. Em uma modalidade, o método de seleção de candidatos a fármacos inclui comparar o nível de expressão na ausência do fármaco candidato à nível de expressão na presença do fármaco candidato, em que a concentração do fármaco candidato pode variar quando presente, e em que a comparação pode ocorrer durante tratamento ou após tratamento com o candidato a fármaco. Em uma modalidade típica, o espécime celular expressa pelo menos dois perfis de genes de expressão. Os perfis de genes poderão mostrar um aumento ou diminuição.

Em uma modalidade, o perfil de gene relacionado a psoríase é usado para criar um método baseado em ensaio para finalidades prognósticas ou diagnósticas, método este que compreende:

(a) preparar uma mistura representativa de ácidos nucleicos a partir de um espécime obtido de um paciente e motivar a amostra de ácidos nucleicos na mistura ser marcada com um marcador detectável;

(b) contatar uma amostra com um ensaio que compreende uma pluralidade de segmentos de ácidos nucleicos, em que cada segmento de ácido nucleico é imobilizado a uma expressão distinta e conhecida em uma superfície de substrato, em que o painel de biomarcadores relacionados a psoríase são identificados como uma característica do ensaio por expressão, no qual o ensaio adicionalmente compreende pelo menos uma calibração de ácido nucleico em uma expressão conhecida no substrato, no qual contatação é realizada sob condições em que uma amostra de ácido nucleico especificamente poderá ligar-se ao segmento de ácido nucleico imobilizado nos ensaios;

(c) efetuar uma comparação estatística de todas as amostras de teste de pacientes tratados e um padrão de referência; e

(d) comparar o padrão de alterações de intensidade em características em relação a amostra de teste para o padrão de alterações de in-

tensidade em relação a aquelas características que são membros do perfil genético relacionado à psoríase com padrões históricos para amostras tomadas de paciente responsivos a tratamento com CNT01275.

5 Em uma modalidade alternativa, a presente invenção compreende um kit para diagnosticar psoríase e/ou doenças ou distúrbios relacionados por identificação e utilização de agentes e/ou candidatos-alvo que modulam tais doenças ou distúrbios e para determinar a eficácia do tratamento de psoríase e/ou doenças ou distúrbios relacionados baseado no padrão de expressão genético.

10 Uma outra modalidade da presente invenção refere-se a agonistas e/ou antagonistas da transcrição dos genes ou dos produtos gênicos do painel genético relacionado a psoríase e um método de utilização de antagonistas de painel genético relacionado a psoríase, incluindo anticorpos direcionados no sentido de produtos do painel genético relacionado a psoríase,
15 para tratar psoríase ou distúrbios correlatos.

Em um aspecto, o antagonista de painel genético relacionado a psoríase é um anticorpo que especificamente se liga ao produto de painel genético relacionado a psoríase. Uma vantagem particular de tais anticorpos é que eles são capazes de ligar produto do painel genético relacionado a
20 psoríase de uma maneira que impede sua ação. O método da presente invenção desse modo emprega anticorpos que apresentam a propriedade de neutralização desejável que os tornam idealmente adequados para tratamento terapêutico e preventivo de estados de doença associados a vários distúrbios relacionados à pele em pacientes humanos ou não-humanos.
25 Consequentemente, a presente invenção refere-se a um método de tratamento de psoríase ou uma doença ou condição correlata em um paciente com necessidade de tal tratamento que compreende administrar ao paciente uma quantidade de um anticorpo de produto do painel genético neutralizante relacionado a psoríase para inibir a doença ou condição relacionada ao
30 pulmão.

Em um outro aspecto, a invenção proporciona métodos de modulação da atividade de um gene do painel genético relacionado a psoríase

que compreende contatar uma célula com um agente (por exemplo, antagonista ou agonista) que modula (inibe ou acentua) a atividade ou expressão do gene de painel genético relacionado a psoríase de tal modo que atividade ou expressão na célula é modulada. Em uma modalidade preferida, o agente
 5 é um anticorpo que especificamente liga-se ao painel genético relacionado a psoríase. Em outras modalidades, o modulador é um peptídeo, peptideomimético, ou outra molécula pequena.

A presente invenção também proporciona métodos de tratamento de um indivíduo que apresenta psoríase ou distúrbio relacionado em que
 10 o distúrbio pode ser melhorado por meio da modulação da quantidade ou atividade do painel genético relacionado a psoríase. A presente invenção também proporciona métodos de tratamento de um indivíduo que apresenta um distúrbio caracterizado por atividade aberrante do produto de painel genético relacionado a psoríase ou um de seus polinucleotídeos de codificação
 15 administrando ao indivíduo um agente que é um modulador da atividade do produto de painel genético relacionado a psoríase ou um modulador da expressão de um painel genético relacionado a psoríase.

Em uma modalidade, o modulador é um polipeptídeo ou composto de molécula pequena. Em uma outra modalidade, o modulador é um
 20 polinucleotídeo. Em uma modalidade particular, o antagonista de painel genético relacionado a psoríase é uma molécula de siRNA, uma molécula de shRNA, uma molécula antissentido, uma ribozima, ou uma DNazima capaz de impedir a produção de painel genético relacionado a psoríase por meio de células.

25 A presente invenção adicionalmente proporciona qualquer invenção descrita aqui.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

As figuras 1A-D mostram o padrão de expressão genética de membros de painel BLMH (A), IL1F5 (B), IL-8 (C), e PLAT (D) detectado por
 30 um método quantitativo RT-PCR.

As figuras 2A-D mostram o padrão de expressão genética de membros do painel SERPINB3 (A), SERPINB4 (B), GJB2 (C), e IL1F9 (D)

detectado por um método quantitativo RT-PCR.

Descrição Detalhada da Invenção

Definições

5 As definições seguintes são apresentadas para ilustrar e definir o significado e escopo de vários termos usados para descrever a invenção neste relatório.

Uma "atividade", uma atividade biológica, e uma atividade funcional de um polipeptídeo refere-se a uma atividade exercida por um gene do painel genético relacionado a psoríase em resposta a sua interação específica com uma outra proteína ou molécula conforme determinada *in vivo*, *in situ*, ou *in vitro*, de acordo com técnicas-padrão. Tais atividades podem ser uma atividade direta, tal como uma associação a, ou uma atividade enzimática em uma segunda proteína, ou uma atividade indireta, tal como um processo celular mediado por interação da proteína com uma segunda
10 proteína ou uma série de interações como em sinalização intracelular ou a cascata de coagulação.

Um "anticorpo" inclui qualquer polipeptídeo ou peptídeo que contém molécula que compreende pelo menos uma parte de uma molécula imunoglobulina, tal como, mas sem se limitar a, pelo menos uma região de complementaridade determinante (CDR) de uma cadeia pesada ou leve ou uma parte de ligação a ligante desta, uma região variável de cadeia pesada ou cadeia leve, uma região constante de cadeia pesada ou cadeia leve, uma região de estrutura, ou qualquer parte, fragmento ou variante desta. O termo "anticorpo" é adicionalmente pretendido abranger anticorpos, fragmentos de
20 digestão, partes especificadas e variantes desta, incluindo anticorpos miméticos ou que compreendem partes de anticorpos que imitam a estrutura e/ou função de um anticorpo ou fragmento especificado ou parte deste, incluindo anticorpos de cadeia única e fragmentos destes. Por exemplo, fragmentos de anticorpos incluem, mas sem se limitar aos mesmos, fragmentos Fab (por exemplo, por meio de digestão de papaína), Fab' (por exemplo, por meio de digestão de pepsina e redução parcial) e F(ab')₂ (por exemplo, por meio de digestão de pepsina), facb (por exemplo, por meio de digestão de plasmina),
25
30

pFc' (por exemplo, por meio de digestão de pepsina ou plasmina), Fd (por exemplo, por meio de digestão de pepsina, redução parcial e reagregação), Fv ou scFv (por exemplo, por meio de técnicas de biologia molecular), são abrangidos pela invenção (ver, por exemplo, Colligan, e outros, eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NI (1994-2001); Colligan e outros, *Current Protocols in Polypeptide Science*, John Wiley & Sons, NI (1997-2001)).

Os termos "ensaio" ou "microensaio" ou "*biochip*" ou "*chip*" conforme usados neste relatório referem-se a artigos de manufatura ou dispositivos que compreendem uma pluralidade de elementos-alvo imobilizados, cada elemento-alvo que compreende um "clone", "característica", "ponto" ou área definida que compreende uma composição particular, tal como uma molécula biológica, por exemplo, uma molécula de ácido nucléico ou polipeptídeo, imobilizado para uma superfície sólida, conforme discutida em detalhe adicional, abaixo.

"Complemento de" ou "complementar a" uma sequência de ácido nucléico da invenção refere-se a uma molécula de polinucleotídeo que apresenta uma sequência-base complementar e orientação reversa quando comparada de um primeiro polinucleotídeo.

"Identidade", conforme conhecido no estado da técnica, é uma relação entre duas ou mais sequências polipeptídicas ou duas ou mais sequências polinucleotídicas, conforme determinadas por comparação das sequências. No estado da técnica, "identidade" também significa o grau de afinidade de sequência entre sequências polipeptídicas ou polinucleotídicas, conforme determinado pelo emparelhamento entre cadeias (*strings*) dessas sequências. "Identidade" e "similaridade" podem ser prontamente calculadas por métodos conhecidos, incluindo, mas sem se limitar aos mesmos, aqueles descritos in *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nova Iorque, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nova Iorque 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, Parte I, Griffin, A. M., e Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nova Jérsei, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von

Heinje, G., *Academic Press*, 1987; e *Sequence Analysis Iniciador*, Gribskov, M. e Devereux, J., eds., *M. Stockton Press*, Nova Iorque, 1991; and Carillo, H., and Lipman, D., *Siam J. Applied Math.*, 48:1073 (1988). Além disso, valores para identidade percentual podem ser obtidos de alinhamentos de sequência de aminoácidos e nucleotídeos gerados usando os ajustes predefinidos para o componente AlignX de Vetor NTI Suite 8.0 (*Informax, Frederick, MD*).

Os termos "especificamente hibridizar a", "hibridizando especificamente a", "hibridização específica" e "seletivamente hibridizar a", conforme usados neste relatório refere-se à ligação, duplexação, ou hibridização de uma molécula de ácido nucléico preferencialmente, com uma sequência particular de nucleotídeos sob condições rigorosas. O termo "condições rigorosas" refere-se a condições sob as quais uma sonda hibridizará preferencialmente a sua subsequência-alvo; e a um grau menor a, ou não de modo algum a, outras sequências. Uma "hibridização rigorosa" e "condições de lavagem de hibridização rigorosa" no contexto de hibridização de ácido nucleico (por exemplo, como no ensaio, hibridizações *Southern* ou *Northern*) são sequências dependentes, e são diferentes sob parâmetros ambientais diferentes. Condições de hibridização alternativas que podem ser usadas para prática da invenção são descritas em detalhes, abaixo. Em aspectos alternativos, as condições de hibridização e/ou lavagem são realizadas sob condições moderadas, condições rigorosas e condições muito rigorosas, conforme descritas em detalhes adicionais, abaixo. Condições de lavagem alternativas são também usadas em diferentes aspectos, conforme descritos em detalhes adicionais, neste relatório.

As expressões "molécula biológica marcada" ou "marcada com uma composição detectável" ou "marcada com uma metade detectável" conforme usadas neste relatório referem-se a uma molécula biológica, por exemplo, um ácido nucléico, o qual compreende uma composição detectável, isto é, uma marca, conforme descrita em detalhes, abaixo. A marca pode também ser uma outra molécula biológica, conforme um ácido nucléico, por exemplo, um ácido nucleico na forma de uma estrutura com formato de

grampo de cabelo (stem-loop) como um "*molecular beacon*," conforme descrito abaixo. Isso inclui incorporação de bases marcadas (ou, bases que podem ligar-se a uma marca detectável) no ácido nucléico mediante, por exemplo, *nick translation*, extensão de *iniciador* aleatório, amplificação com 5 *primers* degenerados, e similares. Qualquer marca pode ser usada, por exemplo, marcas quimioluminescentes, radiomarcas, marcas enzimáticas e similares. A marca pode ser detectável por quaisquer meios, por exemplo, detecção visual, espectroscópica, fotoquímica, bioquímica, imunoquímica, física, química e/ou quimiluminescente. A invenção pode usar ensaios que 10 compreendem ácidos nucleicos imobilizados que compreendem marcas detectáveis.

O termo "ácido nucléico" conforme usado neste relatório refere-se a um desoxirribonucleotídeo (DNA) ou ribonucleotídeo (RNA) em forma de mono ou dupla-fita. O termo abrange ácidos nucleicos que contêm análogos 15 de nucleotídeos naturais conhecidos. O termo ácido nucleico é usado intercambiavelmente com gene, DNA, RNA, cDNA, mRNA, *iniciador* de oligonucleotídeo, sonda e produto de amplificação. O termo também abrange análogos de estrutura principal de DNA, tais como fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, fosforamidato, fosfotriéster alquílico, sulfamato, 3'-tioacetal, metileno(metilimino), 3'-N-carbamato, carbamato de morfoli- 20 no, e ácidos nucleicos peptídicos (PNAs).

Os termos "amostra" ou "amostra de ácidos nucleicos" conforme usados neste relatório referem-se a uma amostra que compreende um DNA ou RNA, ou ácido nucleico representativo de DNA ou RNA isolado de uma 25 fonte natural. Uma "amostra de ácidos nucleicos" é em uma forma adequada para hibridização (por exemplo, como uma solução aquosa solúvel) com um outro ácido nucleico (por exemplo, sondas imobilizadas). A amostra de ácido nucleico poderá ser isolada, clonada, ou extraída de células ou tecidos particulares. A amostra de células ou tecidos a partir da qual a amostra de ácido 30 nucleico é preparada é tipicamente tomada de um paciente que apresenta ou suspeita de apresentar psoríase ou uma doença ou condição correlata. Métodos de isolamento de amostras celulares e tissulares são bem-conhe-

cidos daqueles versados na técnica e incluem, mas sem se limitar aos mesmos, aspirações, seções de tecidos, biópsias com agulha, e similares. Frequentemente, a amostra será uma "amostra clínica" que é uma amostra derivada de um paciente, incluindo seções de tecidos tais como seções congeladas ou seções de parafina tomadas para finalidades histológicas. A amostra pode também ser derivada de sobrenadantes (de células) ou as próprias células tomadas de pacientes ou de culturas celulares, células de cultura tissulares e outros meios em que poderá ser desejável detectar a resposta para fármacos candidatos. Em alguns casos, os ácidos nucleicos poderão ser amplificados usando técnicas-padrão tal como PCR, antes da hibridização. A sonda pode ser produzida de, e coletivamente pode ser representativa de uma fonte de ácidos nucleicos de uma ou mais porções, ou mais particular (pré-selecionadas) de, por exemplo, uma coleção de produtos de amplificação de reação em cadeia de polimerase (PCR), substancialmente um cromossomo completo ou um fragmento de cromossomo, ou substancialmente um genoma total, por exemplo, como uma coleção de clones, por exemplo, BACs, PACs, YACs, e similares (ver abaixo).

"Ácidos nucléicos" são polímeros de nucleotídeos, em que um nucleotídeo compreende uma base ligada a um açúcar, cujos açúcares são por sua vez ligados uns aos outros por meio de um intercessor pelo menos molécula bivalente, tal como ácido fosfórico. Em ácidos nucleicos que ocorrem naturalmente, o açúcar é 2'-desoxirribose (DNA) ou ribose (RNA). Poli ou oligonucleotídeos antinaturais contêm bases modificadas, açúcares, ou moléculas de ligação, mas são geralmente entendidas imitar a natureza complementar dos ácidos nucleicos que ocorrem naturalmente após os quais elas são projetadas. Um exemplo de um oligonucleotídeo antinatural é uma composição de molécula anti-sentido que apresenta uma estrutura principal de fosforotiorato. Um "oligonucleotídeo" geralmente refere-se a uma molécula de ácido nucléico que apresenta menos de 30 nucleotídeos.

O termo "perfil" significa um padrão e refere-se à magnitude e direção de mudança de várias características. O perfil poderá ser interpretado rigosamente, isto é, onde a variação na magnitude e/ou número de ca-

racterísticas dentro do perfil que exhibe a característica é substancialmente similar a um perfil de referência ou poderá ser interpretado menos rigorosamente, por exemplo, exigindo uma tendência em vez de um emparalhamento absoluto de toda ou um subconjunto de características de aspectos.

5 Os termos "proteína", "polipeptídeo," e "peptídeo" incluem "análogos", ou "variantes conservativas" e "miméticos" ou "peptídeomiméticos" com estruturas e atividade que substancialmente corresponde ao polipeptídeo a partir do qual a variante derivou-se, conforme discutido em detalhes acima.

Um "polipeptídeo" é um polímero de resíduos aminoácidos unido
10 por ligações peptídicas, e um peptídeo geralmente refere-se a polímeros de aminoácidos de 12 ou menos resíduos. Ligações peptídicas podem ser produzidas naturalmente conforme direcionadas pelo padrão de ácido nucleico ou sinteticamente por métodos bem-conhecidos no estado da técnica.

Uma "proteína" é uma macromolécula que compreende uma ou
15 mais cadeias de polipeptídeos. Uma proteína poderá adicionalmente compreender grupos substituintes ligados aos grupos laterais dos aminoácidos não envolvidos na formação das ligações de peptídeos. Tipicamente, proteínas formadas por expressão de células eucarióticas também contêm carboidratos. Proteínas são definidas neste relatório em termos de sua sequência ou estrutura principal de aminoácido ou e, substituintes não são
20 especificados, se conhecidos ou não.

O termo "receptor" denota uma molécula que apresenta a capacidade de afetar atividade biológica, em por exemplo, uma célula, como resultado de interação com um ligante específico ou parceiro de ligação. Receptores ligados a membrana celular são caracterizados por um domínio de
25 ligação com ligante extracelular, um ou mais domínios que atravessam a membrana (membrane spanning) ou domínios de transmembranas, e um domínio efetuator intracelular que é tipicamente envolvido na transdução de sinais. Ligação com ligante a receptores de membrana celular causa alterações no domínio extracelular que são comunicados através da membrana
30 celular, interação direta ou indireta com uma ou mais proteínas intracelulares, e altera propriedades celulares, tais como atividade enzimáti-

ca, forma celular, ou perfil de expressão genética. Receptores poderão também ser livres à superfície celular e poderão ser citosólicos, nucleares, ou liberados da célula totalmente. Receptores não-celulares associados são denominados receptores solúveis ou ligantes.

5 Todas as publicações ou patentes citadas neste relatório são totalmente incorporadas neste relatório como referência, se ou não especificamente designadas conseqüentemente, conforme mostra o estado da técnica quando da presente invenção e/ou proporcionam descrição e capacidade da presente invenção. Publicações referem-se a quaisquer publicações científicas ou patentes, ou qualquer outra informação disponível em qualquer formato de mídia, incluindo todos os formatos registrados, eletrônicos ou impressos. As referências seguintes são totalmente incorporadas neste relatório como referência: Ausubel, e outros, ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NI (1987-2001); Sambrook, e outros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Edição, Cold Spring Harbor, NI (1989); Harlow e Lane, antibodies, a *Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NI (1989); Colligan, e outros, eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NI (1994-2001); Colligan e outros, *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NI (1997-2001).

20 Identificação e Validação de Painel Genético

CNTO 1275 é um anticorpo de IgG1 humana anti-IL-12p40 humano de Centocor, Inc. que se liga à subunidade p40 de IL-12 e IL-23 humana. CNTO 1275 é em ensaios clínicos para o tratamento de psoríase.

25 Teste clínico inicial de CNTO 1275 em pacientes com psoríase moderada a grave (designação de estudo T01) demonstrou melhoria clínica significativa após uma única dose IV (Kauffman, CL e outros, 2004. *J. Invest. Dermatol.* **123**:1037-1044). Uma fase I, primeiro em humano, estudo aberto marcado não-randomizado demonstrou que uma única infusão intravenosa de CNTO1275 é geralmente bem-tolerada e induz melhorias dependentes de concentração de lesões psoriáticas. Embora psoríase seja uma das doenças inflamatórias mediadas por células T mais prevalentes em humanos
30 e entre as doenças e distúrbios inflamatórios mediados imunes mais comun-

s, um autoantígeno não foi identificado. A patogênese de psoríase pensa-se depender da ativação de células T lesionais e/ou circulantes e seus produtos segregados que levam a hiperproliferação e angiogênese de queratinócitos com ectasia marcada de vasos sanguíneos.

5 No estudo T01, dezoito (18) pacientes com área superficial corporal que varia de 3% a 35% e pelo menos duas placas localizadas no tronco ou extremidades foram tratadas com uma única infusão intravenosa. Doses variaram de 0,1 a 5,0 mg por kg. Não houve nenhum evento adverso grave relacionado a CNTO1275. Os eventos adversos mais comumente rela-
10 tados incluídos transitórios diminuem em células CD4+ e CD16/56+, dor de cabeça, sintomas de resfriado e dor no local da biópsia. Doze de 18 indivíduos (67%) obtiveram pelo menos 75% de melhoria no índice de atividade e gravidade de psoríase (PASI) entre 8 e 16 semanas após administração do estudo. Melhorias clínicas foram dependentes de concentração.

15 Em um estudo similar, TO2, conforme descrito no Exemplo 1, análise de perfil genético por meio de microensaio usando amostras de biópsia da pele de indivíduos no estudo, resultou na identificação de um painel genético indicador de prognóstico que foi correlativo com eficácia de tratamento com CNTO 1275 antes de melhoria clínica visível conforme medida
20 pelo escore de PASI.

 A presente invenção proporciona novos métodos de diagnose de distúrbios associados a psoríase, bem como métodos de seleção de composições que modulam os sintomas de psoríase, particularmente as lesões psoriáticas da pele. Por "psoríase", "lesões psoriáticas da pele", "condições relacionadas a psoríase" ou equivalentes gramaticais conforme usados
25 neste relatório, entende-se um estado ou condição de doença que é marcado por doença inflamatória mediada por células T levando à hiperproliferação e angiogênese de queratinócitos com ectasia marcada de vasos sanguíneos, isto é, erupção de lesões cutâneas. Outros distúrbios cutâneos de
30 células T inclui: linfoma cutâneo de células T.

 No tratamento de psoríase ou um distúrbio correlato, seria desejável limitar respostas patogênicas a células T. A família IL-12 de citocinas,

IL-12, IL-23, foi identificada como sendo envolvida em respostas imunes induzidas por Th1. Portanto, um antagonista de todos os membros (não somente limitado a IL-12 ou IL-23) que compartilha a subunidade comum beta (p40) foi selecionado como um primeiro produto terapêutico em humanos para tratar psoríase.

Em um aspecto, os níveis de expressão de genes são determinados em diferentes amostras de paciente das quais informação de diagnose é desejada, para proporcionar perfis de expressão. Um perfil de expressão de uma amostra particular é essencialmente uma "impressão digital" do estado da amostra; embora dois estados poderão apresentar qualquer gene particular similarmente expresso, a avaliação de vários genes simultaneamente permite a geração de uma perfil de expressão genética que é única para o estado da amostra de paciente. Isto é, tecido normal poderá ser distinguido de tecido de lesão e tecido de um paciente tratado poderá ser distinguido de um paciente não-tratado. Por comparação de perfis de expressão de tecido em diferentes estados da doença que são conhecidos, informação em relação a esses genes que é importante (incluindo tanto indução quanto inibição (*up- and down-regulation*) de genes) em cada um desses estados é obtida.

A identificação de sequências (genes) que são diferencialmente expressas em tecido de doença permite o uso dessa informação de várias maneiras. Por exemplo, a avaliação de um regime de tratamento particular poderá ser avaliada. Similarmente, diagnose poderá ser feita ou confirmada comparando amostras de pacientes com os perfis de expressão conhecidos. Além disso, esses perfis de expressão genética (ou genes individuais) permitem seleção de candidatos a fármaco com o propósito de imitar ou alterar um perfil de expressão particular; por exemplo, seleção pode ser feita de fármacos que suprimem o perfil de expressão angiogênico.

Isso poderá ser feito por meio de *biochips* que compreendem conjuntos dos importantes genes de doença, que podem em seguida ser usados nessas triagens. Esses métodos podem também ser realizados com base em proteína; isto é, níveis de expressão protéica das proteínas de pro-

duto gênico relacionado a psoríase podem ser avaliados de propósitos diagnósticos ou para selecionar agentes candidatos. Além disso, as sequências de ácidos nucleicos que compreendem o perfil gênico relacionado a psoríase pode ser usado para projetar um produto terapêutico, incluindo a administração de ácidos nucleicos antissentido, ou a proteína codificada pela sequência gênica pode ser administrada como um componente de uma vacina.

Desse modo, a presente invenção proporciona informação sobre sequências de ácidos nucleicos e protéicas que são diferencialmente expressas em psoríase, neste relatório denominadas "sequências genéticas relacionadas a psoríase". Conforme descritas em linhas gerais abaixo, sequências genéticas relacionadas à psoríase incluem aquelas que são induzidas (isto é, expressas em um nível superior) em distúrbios associados a psoríase, bem como aquelas que são inibidas (isto é, expressas em um nível inferior). Em uma modalidade preferida, as sequências genéticas relacionadas à psoríase são de humanos; contudo, como será avaliado por aqueles versados no estado da técnica, sequências genéticas relacionadas à psoríase de outros organismos poderão ser úteis em modelos animais de avaliação de doença e fármaco; desse modo, outras sequências genéticas relacionadas à psoríase são proporcionadas, de vertebrados, incluindo mamíferos, incluindo roedores (ratos, camundongos, hamsters, porquinho-da-índia, etc.), primatas, animais de fazenda (incluindo ovelhas, cabras, porcos, vacas, cavalos, etc). Sequências genéticas relacionadas à psoríase de outros organismos poderão ser obtidas usando as técnicas conhecidas no estado da técnica.

Sequências genéticas relacionadas à psoríase podem incluir tanto sequências de ácidos nucleicos quanto de aminoácidos. Em uma modalidade preferida, as sequências genéticas relacionadas à psoríase são ácidos nucleicos recombinantes. Pelo termo "ácido nucleico recombinante" neste relatório entende-se ácido nucléico, originalmente formado *in vitro*, em geral, pela manipulação de ácido nucléico por meio de polimerases e endonucleases, em uma forma não normalmente encontrada na natureza. Desse modo,

um ácido nucleico isolado, em uma forma linear, ou um vetor de expressão formado *in vitro* ligando moléculas de DNA que não são normalmente unidas, são ambos considerados recombinantes para os propósitos desta invenção. Entende-se que uma vez que um ácido nucleico recombinante é produzido e reintroduzido em uma célula hospedeira ou organismo, ele replicará não-recombinantemente, isto é, usando o mecanismo celular *in vivo* da célula hospedeira em vez de manipulações *in vitro*; contudo, esses ácidos nucleicos, uma vez produzidos recombinantemente, embora de forma subsequente replicados não-recombinantemente, são ainda considerados recombinantes para as finalidades da invenção.

Método de Prática da Invenção

A invenção proporciona *in silico*, métodos com base em ensaio contando com a quantidade relativa de uma molécula de ligação (por exemplo, sequência de ácido nucléico) em duas ou mais amostras. Também proporcionados são métodos implementados por computador para determinar a quantidade relativa de uma molécula de ligação (por exemplo, sequência de ácido nucléico) em duas ou mais amostras e usar a quantidade de ligação relativa determinada para diagnose e estágio da doença, predizer sensibilidade a uma terapia particular, e monitorar e acentuar tratamento terapêutico.

Na prática dos métodos da invenção, duas ou mais amostras de moléculas biológicas marcadas (por exemplo, ácido nucléico) são aplicadas a dois ou mais ensaios, em que os ensaios apresentam substancialmente o mesmo complemento de molécula de ligação imobilizada (por exemplo, ácido nucleico imobilizado capaz de hibridização com ácido nucleico de amostra marcada). Os dois ou mais ensaios são tipicamente cópias múltiplas do mesmo ensaio. Contudo, porque cada "ponto", "clone" ou "aspecto" no ensaio apresentam moléculas biológicas similares (por exemplo, ácidos nucléicos da mesma sequência) e as moléculas biológicas (por exemplo, ácido nucléico) em cada ponto são conhecidas, como é típico de ácido nucléico e outros ensaios, não é necessário que os ensaios múltiplos usados na invenção sejam idênticos na configuração é, apenas necessário que a posição de cada aspecto no substrato por meio conhecido, isto é, ter uma expressão.

Desse modo, em um aspecto, amostras de moléculas biológicas múltiplas (por exemplo, ácido nucléico) são comparativamente ligadas ao ensaio (por exemplo, simultaneamente hibridizadas) e a informação reunida é codificada de tal modo que os resultados sejam baseados nas propriedades inerente do
 5 aspecto (por exemplo, a sequência de ácido nucleico) e não sua posição sobre o substrato.

Amplificação de Ácidos Nucléicos

Amplificação usando *iniciadores* de oligonucleotídeos podem ser usados para gerar ácidos nucléicos usados nas composições e métodos da
 10 invenção, para detectar ou medir níveis de amostras de teste ou controle hibridizadas para um ensaio, e similares. Aquele versado na técnica pode selecionar e projetar *iniciadores* de amplificação de oligonucleotídeos adequados. Métodos de amplificação são também bem-conhecidos na técnica, e incluem, por exemplo, reação de cadeia polimerase PCR (PROTOCOLOS
 15 PCR, *A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS*, ed. Innis, Academic Press, N.I. (1990) e PCR STRATEGIES (1995), ed. Innis, Academic Press, Inc., N.I., ligase chain reaction (LCR) (ver, por exemplo, Wu (1989) *Genomics* 4:560; Landegren (1988) *Science* 241:1077; Barringer (1990) *Gene* 89:117); transcription amplification (ver, por exemplo, Kwoh (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173); e self-sustained sequence replication (ver, por exemplo, Guatelli (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874); Q replicase amplification (ver, por exemplo, Smith (1997) *J. Clin. Microbiol.* 35:1477-1491), amplification assay Q-beta replicase (ver, por exemplo, Burg (1996) *Mol. Cell. Probes* 10:257-271) e other RNA polymerase mediated techniques
 20 (por exemplo, NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario); ver também Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:307-316; Sambrook; Ausubel; Patente U.S. Nos. 4.683.195 e 4.683.202; Sooknanan (1995) *Biotechnology* 13:563-564.

Ácidos Nucleicos de Hibridização

Na prática dos métodos da invenção, amostras de teste e contro-
 30 le de ácido nucléico são hibridizadas com ácido nucleico imobilizado por sonda, por exemplo, em ensaios. Em aspectos alternativos, a hibridização e/ou condições de lavagem são realizadas sob condições moderadas, con-

dições rigorosas e condições muito rigorosas. Um guia extensivo para a hibridização de ácidos nucleicos é encontrado *in*, por exemplo, *Sambrook Ausubel, Tijssen*. Geralmente, hibridização altamente rigorosa e condições de lavagem são selecionadas ser aproximadamente 5°C menor que o ponto

5 térmico de fusão (T_m) para a sequência específica em uma força iônica definida e pH. O T_m é a temperatura (sob força iônica definida e pH) na qual 50% da sequência-alvo hibridizam com uma sonda perfeitamente emparelhada. Condições muito rigorosas são selecionadas para ser iguais à T_m em relação a uma sonda particular. Um exemplo de condições rigorosas de

10 hibridização para hibridização de ácidos nucleicos complementares que apresentam mais de 100 resíduos complementares em um ensaio ou um filtro em um *Southern* ou *northern blot* é 42°C usando soluções-padrão de hibridização (ver, por exemplo, Sambrook), com a hibridização sendo realizada da noite para o dia. Um exemplo de condições de lavagem altamente

15 rigorosas é a NaCl 0,15 M a 72°C por aproximadamente 15 minutos. Um exemplo de condições de lavagem rigorosas é uma lavagem de 0,2 × SSC a 65°C por 15 minutos (ver, por exemplo, Sambrook). Frequentemente, uma lavagem de alta estringência é precedida por um meio ou lavagem de baixa estringência para remover sinal de sonda de fundamento. Um exemplo de

20 lavagem de estringência média para um dúplex de, por exemplo, mais de 100 nucleotídeos, é 1×SSC a 45°C por 15 minutos. Um exemplo de uma lavagem de baixa estringência para um dúplex de, por exemplo, mais de 100 nucleotídeos, é 4 × para 6 × SSC a 40°C por 15 minutos.

Em aspectos alternativos das composições e métodos da inven-

25 ção, por exemplo, na prática de hibridização comparativa de ácidos nucleicos, tal como hibridização comparativa genômica (CGH) com ensaios, os corantes fluorescentes Cy3® e Cy5® são usados para diferencialmente marcar fragmentos de ácidos nucleicos de duas amostras, por exemplo, o ácido nucleico imobilizado por ensaio versus o ácido nucleico de amostra,

30 ou, ácido nucléico gerado de um controle versus uma célula ou tecido de teste. Muitos instrumentos comerciais são elaborados para acomodar a detecção desses dois corantes. Para aumentar a estabilidade de Cy5®, ou flúors ou outros compostos sensíveis à oxidação, antioxidantes e

ors ou outros compostos sensíveis à oxidação, antioxidantes e sequestrantes de radicais livres podem ser usados nas misturas de hibridização, a hibridização e/ou as soluções de lavagem. Desse modo, sinais de Cy5® são dramaticamente aumentados e tempos de hibridização mais longos são possíveis. Ver WO 0194630 A2 e Pedido de Patente dos Estados Unidos Nº 20020006622.

Para adicionalmente aumentar a sensibilidade de hibridização, hibridização pode ser realizada em um ambiente de umidade controlada, insaturada; desse modo, eficiência de hibridização é significativamente aperfeiçoada se a umidade não é saturada. Ver, WO 0194630 A2 e Pedido de Patente dos Estados Unidos Nº 20020006622. A eficiência de hibridização pode ser aperfeiçoada se a umidade é dinamicamente controlada, isto é, se a umidade altera durante hibridização. Transferência de massa será facilitada em um ambiente de umidade dinamicamente equilibrada. A umidade no ambiente de hibridização pode ser ajustada gradativa ou continuamente. Dispositivos de ensaio que compreendem armazenamentos e controles que permitem o operador controlar a umidade durante estágios de pré-hibridização, hibridização, lavagem e/ou detecção podem ser usados. O dispositivo pode apresentar detecção, controle e componentes de memória que permitem pré-programação dos controles de umidade e temperatura (que são constantes e precisos ou que flutuam, e outros parâmetros durante o ciclo total processual, incluindo etapas de pré-hibridização, hibridização, lavagem e detecção. Ver, WO 0194630 A2 e Pedido de Patente dos Estados Unidos Nº 20020006622.

Os métodos da invenção podem compreender condições de hibridização que compreendem flutuação osmótica. Eficiência de hibridização (isto é, tempo para equilíbrio) pode também ser acentuada por um ambiente de hibridização que compreende alterar hiper-/hipotonicidade, por exemplo, um gradiente soluto. Um gradiente soluto é produzido no dispositivo. Por exemplo, uma solução de hibridização de baixo teor salino é colocada em um lado da câmara de ensaio de hibridização e um tampão de maior teor salino é colocado no outro lado para gerar um gradiente soluto na câmara. Ver, WO

0194630 A2 e Pedido de Patente dos Estados Unidos Nº 20020006622.

Bloqueio da Capacidade de Sequências de Ácidos nucleicos Repetitivas para Hibridização

Os métodos da invenção podem compreender uma etapa de
5 bloqueio da capacidade de sequências de ácidos nucleicos repetitivas para
hibridização (isto é, bloqueio da "capacidade de hibridização") nos segmen-
tos de ácidos nucleicos imobilizados. A capacidade de hibridização de sequ-
ências de ácidos nucleicos repetitivas nas sequências de ácidos nucleicos
de amostra pode ser bloqueada misturando sequências de ácido nucleico de
10 amostra com sequências repetitivas de ácidos nucleicos não-marcados ou
alternativamente marcados. Sequências de ácidos nucleicos de amostra
podem ser misturadas com sequências repetitivas de ácidos nucleicos antes
da etapa de contato com os segmentos de ácidos nucleicos imobilizados no
arranjo. Sequências de bloqueio são, por exemplo, Cot-1 DNA, DNA de es-
15 perma de salmão, ou sequências genômicas específicas repetitivas. As se-
quências repetitivas de ácidos nucleicos podem ser não-marcadas. Vários
métodos de remover e/ou impossibilitar a capacidade de hibridização de se-
quências repetitivas usando, por exemplo, Cot-1 são conhecidos; ver, por
exemplo, Craig (1997) *Hum. Genet.* 100:472-476; WO 93/18186. Sequências
20 repetitivas de DNA podem ser removidas de sondas de biblioteca por meio
de purificação magnética e afinidade de RPC, ver, por exemplo, Rauch
(2000) *J. Biochem. Biophys. Methods* 44:59-72.

Arranjos são genericamente uma pluralidade de elementos-alvo
imobilizados sobre a superfície da placa conforme definidos "pontos" ou "a-
25 glomerados" ou "aspectos," com cada elemento-alvo compreendendo uma
ou mais moléculas biológicas (por exemplo, ácidos nucleicos ou polipeptí-
deos) imobilizadas a uma superfície sólida para ligação específica (por e-
xemplo, hibridização) com uma molécula em uma amostra. Os ácidos nucle-
icos imobilizados podem conter sequências de mensagens específicas (por
30 exemplo, como bibliotecas de cDNA) ou genes (por exemplo, bibliotecas ge-
nômicas), incluindo um genoma humano. Outros elementos-alvo podem con-
ter sequências de referência, e similares. As moléculas biológicas dos arran-

jos poderão ser dispostas na superfície sólida em diferentes tamanhos e diferentes densidades. As densidades das moléculas biológicas em um *aglomerado* e o número de *aglomerados* no ensaio dependerá de vários fatores, tal como a natureza da marca, o suporte sólido, o grau de hidrofobicidade da superfície do substrato, e similares. Cada aspecto poderá compreender substancialmente a mesma molécula biológica (por exemplo, ácido nucleico), ou, uma mistura de moléculas biológicas (por exemplo, ácidos nucleicos de diferentes comprimentos e/ou sequências). Desse modo, por exemplo, um aspecto poderá conter mais de uma cópia de uma parte de DNA clonada, e cada cópia poderá ser quebrada em fragmentos de diferentes comprimentos.

Superfícies de arranjo do substrato sobre as quais as moléculas biológicas (por exemplo, ácidos nucleicos) são imobilizadas podem incluir nitrocelulose, vidro, quartzo, sílica fundida, plásticos e similares, conforme discutidas adicionalmente, abaixo. As composições e métodos da invenção podem incorporar-se em todo ou em parte de projetos de ensaios, e componentes e métodos associados, conforme descritos, por exemplo, *in* Patente Estados Unidos Nºs 6.344.316; 6.197.503; 6.174.684; 6.159.685; 6.156.501; 6.093.370; 6.087.112; 6.087.103; 6.087.102; 6.083.697; 6.080.585; 6.054.270; 6.048.695; 6.045.996; 6.022.963; 6.013.440; 5.959.098; 5.856.174; 5.843.655; 5.837.832; 5.770.456; 5.723.320; 5.700.637; 5.695.940; 5.556.752; 5.143.854; ver também, por exemplo, WO 99/51773; WO 99/09217; WO 97/46313; WO 96/17958; WO 89/10977; ver também, por exemplo, Johnston (1998) *Curr. Biol.* 8:R171-174; Schummer (1997) *Biotechniques* 23:1087-1092; Kern (1997) *Biotechniques* 23:120-124; Solinas-Toldo (1997) *Genes, Chromosomes & Cancer* 20:399-407; Bowtell (1999) *Nature Genetics Supp.* 21:25-32; Epstein (2000) *Current Opinion in Biotech.* 11:36-41; Mendoza (1999) *Biotechniques* 27: 778-788; Lueking (1999) *Anal. Biochem.* 270:103-111; Davies (1999) *Biotechniques* 27:1258-1261.

Superfícies de Substrato

Superfícies de substrato que podem ser usadas nas composições e métodos da invenção incluem, por exemplo, vidro (ver, por exemplo, Patente Estados Unidos Nº 5.843.767), cerâmicas, e quartzo. Os arranjos

podem apresentar superfícies de substrato de um material rígido, semirrígido ou flexível. A superfície de substrato pode ser lisa ou planar, ser formada como cavidades, regiões elevadas, valas gravadas (*etched trenches*), poros, contas, filamentos, ou similares. Superfícies de substrato podem também

5 compreender vários materiais tais como nitrocelulose, papel, substratos cristalinos (por exemplo, arsenieto de gálio), metais, metalóides, poliacrililomorfolida, vários plásticos e copolímeros de plástico, *Nylon*®, *Teflon*®, polietileno, polipropileno, látex, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), raiom, náilon, poli(butirato de vinila), e acetato de celulose. Os substratos poderão ser

10 revestidos e o substrato e o revestimento poderá ser funcionalizado para, por exemplo, permitir conjugação com uma amina.

Arranjos que Compreendem Sequências de Calibração

A invenção contempla o uso de ensaios que compreendem sequências de calibração imobilizadas para normalização dos resultados de

15 reações de hibridização com base em arranjo, e métodos para utilizar essas sequências de calibração, por exemplo, para determinar o número de cópia de uma sequência de calibração para "normalizar" ou "calibrar" perfis de razão. As sequências de calibração podem ser substancialmente as mesmas como uma única sequência em uma sequência de ácido nucleico imobilizado

20 em um ensaio. Por exemplo, uma sequência "marcadora" de cada "ponto" ou "biossítio" em um ensaio (que está presente apenas nesse ponto, tornando-a uma "marcadora" para esse ponto) é representada por uma sequência correspondente em um ou mais ponto(s) de "controle" ou "calibração".

O "pontos de controle" ou "pontos de calibração" são usados para

25 ra "normalização" para proporcionar informação que é seguro e repetível. Pontos de controle podem proporcionar um resultado consistente independente da amostra marcada hibridizada com o ensaio (ou uma molécula de ligação marcada a partir de uma amostra). Os pontos de controle podem ser usados para gerar uma curva de "normalização" ou "calibração" para com-

30 pensar possíveis erros de intensidade entre os dois ensaios (ou mais) usados nos métodos da invenção *in silico*, à base de arranjo.

Um método de gerar um controle no arranjo seria usar uma mis-

tura equimolar de todas as moléculas biológicas (por exemplo, sequências de ácidos nucleicos) manchadas no arranjo e gerar um único ponto. Esse único ponto apresentaria quantidades iguais das moléculas biológicas (por exemplo, sequências de ácidos nucleicos) a partir de todos os outros pontos no arranjo. Pontos múltiplos de controle podem ser gerados variando a concentração da mistura equimolar.

Amostras e Espécimes

A amostra de ácido nucleico poderá ser isolada, clonada, ou extraída de células, tecidos particulares, ou outros espécimes. A amostra de célula ou tecido a partir dos quais a amostra de ácido nucleico é preparada é tipicamente tomada de um paciente que apresenta ou suspeita de apresentar psoríase ou uma condição correlata. Métodos de isolamento de amostras de célula e tecido são bem-conhecidos daqueles versados na técnica e incluem, mas sem se limitar aos mesmos, aspirações, seções de tecido, biópsias com agulha, e similares. Frequentemente, a amostra será uma "amostra clínica" que é uma amostra derivada de um paciente, incluindo sangue total, ou seções de tecidos, tais como seções congeladas ou seções de parafina tomadas para finalidades histológicas. A amostra pode também ser derivada de sobrenadantes (de células) ou as próprias células tomadas de pacientes ou de culturas celulares, células de cultura de tecidos e outros meios em que poderá ser desejável detectar a resposta para fármacos candidatos. Em alguns casos, os ácidos nucleicos poderão ser amplificados usando técnicas-padrão tal como PCR, antes da hibridização.

Em uma modalidade, a presente invenção é um método pós-tratamento de monitorar resolução da doença. O método inclui (1) tomar uma lesão cutânea ou outra espécime de um indivíduo diagnosticado com psoríase ou uma doença ou distúrbio correlato, (2) medir os níveis de expressão dos genes de perfil do painel, (3) comparar o nível de expressão pós-tratamento dos genes com um perfil de referência pré-tratamento em relação ao indivíduo, e (4) determinar o prognóstico de resolução da lesão psoriática monitorando pelo menos um constituinte do perfil genético relacionado a psoríase.

Em uma outra modalidade, a presente invenção é um método de diagnóstico para psoríase e o padrão de referência (amostra) é tomado de um sítio não-envolvido e a amostra teste de uma lesão suspeita.

Métodos de Avaliação de Utilidade de Biomarcador

5 A utilidade de diagnóstico e prognóstico do presente painel genético biomarcador para avaliar uma resposta do paciente a tratamento, prognóstico, ou presença, grau, severidade ou estágio de doença pode ser validada usando outros meios para avaliar um estado de saúde ou doença do paciente. Por exemplo, medição total de doença poderá ser avaliada e registrada por certos métodos de formação de imagem, tais como, mas sem se
10 limitar aos mesmos: avaliação médica, imagem por tecnologia fotográfica, radiométrica, ou ressonância magnética. Índices gerais de saúde ou doença adicionalmente incluem composição sérica ou sanguínea (proteína, enzimas hepáticas, pH, eletrólitos, volume de hemácias, hematócrito, hemoglobina, ou proteína específica). Contudo, em algumas doenças, a etiologia é ainda
15 pobremente entendida. Psoríase é um exemplo de uma tal doença.

A variedade mais comum de psoríase é chamada tipo placa. Pacientes com psoríase tipo placa apresentam placas estáveis, lentamente que se ampliam, as quais permanecem basicamente inalteradas por longos
20 períodos de tempo. As áreas mais comuns para psoríase em placas ocorrer são os cotovelos, joelhos, fissura glútea, e o couro cabeludo.

Envolvimento tende a ser simétrico. Psoríase inversa afeta as regiões intertriginosa, incluindo a axila, virilha, região submamária, e umbigo; ela também tende a afetar o couro cabeludo, palmas, e plantas dos pés. As
25 lesões individuais são placas bruscamente demarcadas mas poderão ser úmidas devido a sua localização. Psoríase em placas geralmente se desenvolve lentamente e percorre em um curso indolente. Raramente remite de forma espontânea.

Psoríase eruptiva (psoríase *guttate*) é mais comum em crianças
30 e adultos jovens. Ela se desenvolve aguçadamente em indivíduos sem psoríase ou naqueles com psoríase de placa crônica. Pacientes apresentam-se com pápulas de escamação muito pequena eritematosa, frequentemente

após infecção do trato respiratório superior com estreptococo hemolítico. A
diagnose diferencial pode incluir pitíriase rósea e sífilis secundária. Psoríase
pustular é uma outra variante. Pacientes poderão apresentar doença locali-
zada às palmas e plantas dos pés ou generalizadas e associadas à febre,
5 mal-estar, diarreia, e artralgias.

Aproximadamente metade de todos os pacientes com psoríase
apresentam envolvimento (complicação) das unhas, aparecendo como um
sinal, espessamento das unhas, ou hiperkeratose subungual. Aproximada-
mente 5 a 10% de pacientes com psoríase apresentam queixas associadas
10 a articulações, e essas são mais frequentemente encontradas em pacientes
com envolvimento na unha. Embora alguns apresentam a ocorrência
coincidente de artrite reumatoide clássica, muitas apresentam doença das
articulações que se enquadram em um de três tipos associados à psoríase:
(1) artrite inflamatória assimétrica mais comumente envolvendo as articula-
15 ções interfalangeais distais e proximais e menos comumente os joelhos,
quadris, tornozelos, e pulsos; (2) uma doença tal como artrite reumatoide
soronegativa; uma parte significativa desses pacientes continuará a desen-
volver uma grave artrite destrutiva; ou (3) doença limitada à estrutura princi-
pal (espondilite psoriática).

20 A etiologia de psoríase é ainda pobremente entendida, mas há
claramente um componente genético para a doença. Mais de 50% de paci-
entes com psoríase relatam uma história positiva de família. Psoríase tem
sido ligada a HLA-Cw6 e, com um grau menor, a HLA-DR7. Lesões
psoriáticas são caracterizadas por infiltração de pele com células T ativadas,
25 que parecem apresentar um papel na patofisiologia de psoríase. Presumi-
velmente, citocinas de células T ativadas elaboram fatores de crescimento
que estimulam hiperproliferação de queratinócitos. Agentes que inibem ativi-
ação de células T, expansão clonal, ou liberação de citocinas pró-
inflamatórias são frequentemente eficazes para o tratamento de psoríase
30 grave.

Tratamento de psoríase depende do tipo, localização, e grau de
doença. Todos os pacientes devem ser instruídos a evitar excesso de seca-

gem ou irritação de sua pele e a manter hidratação cutânea adequada. A maioria de pacientes com psoríase tipo placa localizada, pode ser controlada com glicocorticoides tópicos de poder médio, embora seu uso a longo prazo seja frequentemente acompanhado por perda de eficácia (taquifilaxia) e atrofia da pele. Um análogo tópico de vitamina D (calcipotrieno) e um retinóide (tazaroteno) são também eficazes no tratamento de psoríase e apresentam outros agentes tópicos amplamente substituídos, tais como alcatrão de carvão (*coal tar*), ácido salicílico, e antralina.

10 Luz ultravioleta, natural ou artificial, é uma terapia eficaz para pacientes com psoríase difundida. Luz ultravioleta B (UV-B) é eficaz sozinha, ou poderá ser combinada com alcatrão de carvão ou antralina. A combinação do espectro ultravioleta A (UV-A) com psoralenos orais ou tópicos (PU-VA) é também extremamente eficaz para o tratamento de psoríase, todavia uso a longo prazo poderá ser associado a um aumento na incidência de
15 câncer de células escamosas e melanoma da pele.

Vários outros agentes podem ser usados para doença psoriática grave, difundida. Glicocorticoides orais não devem ser usados para o tratamento de psoríase devido ao potencial para desenvolver psoríase pustular potencialmente fatal quando a terapia é descontinuada. Metotrexato é um
20 agente eficaz, especialmente em pacientes com artrite psoriática; contudo, toxicidade hepática e supressão de medula óssea limita seu uso. O retinoide sintético, acitretina, é eficaz em alguns pacientes com psoríase grave. Ele é um teratogênio potente e não deve ser usado em mulheres de gravidez potencial. A evidência envolvendo psoríase como um distúrbio mediado por
25 células T tem abordado esforços terapêuticos para imunoregulação. Ciclosporina é altamente eficaz em pacientes selecionados com doença grave, mas nefrotoxicidade e hipertensão complicam seu uso.

Infliximab e etanercept, antagonistas de fator de necrose de tumor (TNF-alfa), são no momento aprovados para artrite psoriáticas. Outros
30 antagonistas TNF-alfa e outros agentes que direcionam citocinas pró-inflamatórias, ativação de células T, e tráfico de linfócitos poderá ser útil em suprimir a característica de inflamação de psoríase.

Avaliação e Monitoração de Paciente

Pacientes com psoríase são comumente avaliados usando a Área de Psoríase e Índice de Gravidade (PASI) e Avaliação Médica Global (PGA). O PASI (3) avalia o grau de eritema, espessura, e escamação de placas psoriáticas, e estima o grau de envolvimento de cada um desses componentes em quatro áreas corporais separadas (cabeça, tronco, extremidades superiores e inferiores). O escore de compósito PASI, que varia de 0-72, proporciona uma medida subjetiva e conta com estimativa da área corporal superficial envolvida (BSA). O PGA é um escore de seis pontos que resume a qualidade global (eritema, escamação e espessura) e grau (BSA) de placas em relação à avaliação de linha de referência. Uma resposta do paciente é avaliada como pior, pobre (0-24%), média (25-49%), boa (50-74%), excelente (75-99%), ou esclarecida (100%).

Mais recentemente, a *National Psoriasis Foundation's (NPF's) Medical Advisory Board* desenvolveu um método de cinco componentes: o NPF-Escore de Psoríase (NPF-PS). Os pontos finais primários igualmente pesados do NPF-PS, o qual contribui para um escore total que varia de 0 a 30, inclui endurecimento de duas lesões-alvo, BSA, avaliação médica estática global, avaliação global do paciente, e prurido (Kreuger, G. 1999. *National Psoriasis Foundation Psoriasis Forum* 5:1-5). O NPF-PS fornece peso igual para o paciente e avaliações do investigador global de gravidade clínica. Em segundo lugar, embora prurido seja uma queixa de 79% de pacientes psoriáticos, nem o PASI nem PGA inclui medições de prurido.

Outros distúrbios da pele imunologicamente mediados incluem pênfigo vulgar. Pênfigo vulgar imunologicamente, pênfigo foliáceo, pênfigo paraneoplásico, penfigoide bolhoso, penfigoide gestacional, dermatite herpetiforme, dermatose por IgA linear, epidermólise bolhosa adquiritiva, penfigoide cicatricial, dermatomiosite, lúpus eritematoso, esclerodermia e *morphea*. Dermatomiosita, lúpus eritematoso, escleroderma e *morfeia* são classificadas como doenças auto-imunes sistêmicas com aspectos cutâneos proeminentes.

Outras Doenças da Pele

Quando uma erupção é caracterizada por lesões elevadas, papules (< 1 cm), ou plaques (> 1 cm), em associação com escama, ela é referida como uma lesão papuloescamosa. As doenças-psoríase papuloescamosa mais comuns, tinea, pitíriase rósea, e líquen plano são distúrbios cutâneos primários. Quando lesões psoriáticas são acompanhadas por artrite, a possibilidade de artrite psoriática ou doença de Reiter deve ser considerada. Uma história de úlceras orais, conjuntivite, uveíte, e/ou uretrite pontos para o último diagnóstico. Na psoríase *guttate*, há um início agudo de lesões pequenas uniformes, amplamente espalhada, frequentemente em associação com uma infecção estreptocócica. Lítio, betabloqueadores, infecção por HIV, e um *afunilamento rápido* de glicocorticoides sistêmicos são também conhecidos exacerbar psoríase.

Quando se faz uma diagnose de pitíriase rósea ou *líquen plano*, é importante rever as medicações do paciente porque a erupção pode ser tratada por simplesmente descontinuação do agente opressor. Erupções por fármaco tal como pitíriase rósea são observadas mais comumente com betabloqueadores, inibidores de enzima que convertem angiotensina (ACE), ouro, e metronidazol, enquanto os fármacos que podem produzir uma erupção por liquenoide (liqueniforme) incluem ouro, antimaláricos, tiazidas, quinidina, fenotiazinas, sulfonilureias, e inibidores de ACE. Lesões tal como *líquen plano* são também observadas em doença crônica enxerto-versus-hospedeiro.

Em seus estágios prematuros, linfoma cutâneo de células T (CTCL) poderá ser confundido com eczema ou psoríase, mas ele frequentemente falha a responder à terapia apropriada para essas doenças inflamatórias. CTCL pode desenvolver-se dentro de lesões de parapsoríase de placas grandes e é sugerido por um aumento na espessura das lesões. A diagnose de CTCL é estabelecida por biópsia da pele em que coleções de linfócitos atípicos T são encontrados na epiderme e derme. À medida em que a doença desenvolve-se, envolvimento de tumores cutâneos e linfonodo poderão aparecer.

Em sífilis secundária, há pápulas espalhadas vermelho acastanhadas com escama fina. A erupção frequentemente envolve as palmas e plantas do pé e pode parecer-se com pitíriase rósea. Descobertas associadas são úteis em fazer a diagnose e incluem placas anulares na face, alopecia não-cicatrizante, condiloma lata (com base ampla e úmida), e placas mucosas, bem como linfadenopatia, mal-estar, febre, dor de cabeça, e mialgias. O intervalo entre o cancro primário e o estágio secundário é usualmente de 4 a 8 semanas, e resolução espontânea sem terapia apropriada é observada.

Desse modo, o método da invenção, na medida em que os métodos analíticos da invenção predizem respondedores a doença tipo Th1, pode ser usado para avaliar e recomendar tratamento terapêutico para pacientes apresentando vários sintomas cutâneos.

Embora a maior parte dos genes no painel registraram ser aberrantemente expressos em pele psoriática anteriormente, os padrões de expressão dos genes durante o curso de tratamento não foram estudados no tratamento de psoríase, e nenhum foi identificado como apresentando valor preditivo. O painel de biomarcadores de expressão gênica descrito aqui permite a geração de métodos de ferramentas diagnósticas rápidas e seguras que predizem o resultado clínico de um ensaio de psoríase, ou ferramentas prognósticas de rastreamento a eficácia de terapia de psoríase. Métodos de diagnóstico e prognóstico com base em detectar esses genes em uma amostra são proporcionados. Essas composições poderão ser usadas, por exemplo, para a prevenção e tratamento de uma faixa de doenças inflamatórias mediadas imunes.

Agentes terapêuticos

Antagonistas

Conforme usado neste relatório, o termo "antagonistas" refere-se a substâncias que inibem ou neutralizam a atividade biológica do produto gênico do painel de genes relacionados à psoríase da invenção. Tais antagonistas executam esse efeito em uma variedade de modos. Uma classe de antagonistas ligar-se-á à proteína do produto gênico com afinidade e especificidade suficientes para neutralizar os efeitos biológicos da proteína. Inclui-

das nessa classe de moléculas são anticorpos e fragmentos de anticorpos (tais como, por exemplo, moléculas de F(ab) ou F(ab')₂). Uma outra classe de antagonistas compreendem fragmentos da proteína de produto gênico, muteínas ou moléculas orgânicas pequenas, isto é, peptidomiméticos, que
5 ligar-se-ão aos parceiros ou ligantes de ligação cognatos do produto gênico, desse modo inibindo a atividade biológica da interação específica do produto gênico com seu ligante ou receptor cognato. O antagonista de gene relacionado à psoríase poderá ser de qualquer uma dessas classes contanto que ele seja uma substância que inibe pelo menos uma atividade biológica do
10 produto gênico.

Antagonistas incluem anticorpos direcionados a uma ou mais regiões da proteína de produto gênico ou fragmentos deste, anticorpos direcionados ao ligante ou receptor cognato, e peptídeos parciais do produto gênico ou seus ligantes cognatos que inibem pelo menos uma atividade
15 biológica do produto gênico. Uma outra classe de antagonistas incluem siRNAs, shRNAs, moléculas antissentido e DNazimas que direcionam a sequência genética conforme conhecida na técnica é descrita neste relatório.

Anticorpos adequados incluem aqueles que competem a ligação a produtos gênicos relacionados com psoríase com anticorpos monoclonais
20 que bloqueiam ativação de produto gênico relacionado à psoríase ou impede produto gênico relacionado à psoríase ligar-se a seu ligante cognato, ou impede sinalização do produto gênico relacionado à psoríase.

Um produto terapêutico que direciona o indutor do produto gênico relacionado à psoríase poderá proporcionar melhores chances de sucesso. Expressão gênica pode ser modulada em diversos modos diferentes,
25 incluindo por meio do uso de siRNAs, shRNAs, moléculas antissentido e DNazimas. SiRNAs sintéticos, shRNAs, e DNazimas podem ser projetados para especificamente direcionar um ou mais genes e podem facilmente ser transferidos para células *in vitro* ou *in vivo*.

30 A presente invenção abrange moléculas de ácidos nucleicos antissentidos, isto é, moléculas que são complementares a um ácido nucleico senso que codifica um polipeptídeo de produto gênico relacionado a psoríase.

se, por exemplo, complementar à fita de codificação de uma molécula de cDNA dupla-fita ou complementar a uma sequência de mRNA. Consequentemente, um ácido nucleico antissentido pode ser hidrogênio ligado a um ácido nucleico senso. O ácido nucleico antissentido pode ser complementar a uma fita de codificação total, ou a apenas uma parte desta, por exemplo, toda ou parte da região de codificação de proteína (ou quadro de leitura aberta). Uma molécula de ácido nucleico antissentido pode ser antissentido a toda ou parte de uma região não-codificação da fita de codificação de uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo de produto gênico relacionado a psoríase. As regiões de não-codificação (regiões "5' e 3' não-traduzidas") são as sequências 5' e 3' que flanqueiam a região de codificação e não são traduzidas para aminoácidos.

A invenção também proporciona proteínas quiméricas ou de fusão. Conforme usadas neste relatório, uma "proteína quimérica" ou "proteína de fusão" compreende toda ou parte (preferencial e biologicamente ativa) de um polipeptídeo de produto gênico relacionado a psoríase operavelmente ligado a um polipeptídeo heterólogo (isto é, um polipeptídeo diferente do mesmo polipeptídeo de produto gênico relacionado à psoríase). Dentro da proteína de fusão, o termo "operavelmente ligado" pretende indicar que o polipeptídeo de produto gênico relacionado à psoríase e o polipeptídeo heterólogo são fundidos um com o outro. O polipeptídeo heterólogo pode ser fundido com o término amino ou o término carboxila do polipeptídeo de produto gênico relacionado à psoríase. Em uma outra modalidade, um polipeptídeo de produto gênico relacionado à psoríase ou um domínio ou fragmento ativo deste, pode ser fundido com uma sequência de proteína heteróloga ou fragmento desta, para formar uma proteína quimérica, em que os polipeptídeos, domínios ou fragmentos não são fundidos término a término mas são interpostos na estrutura da proteína heteróloga.

Em ainda uma outra modalidade, a proteína de fusão é uma proteína de fusão imunoglobulina em que toda ou parte de um polipeptídeo de produto gênico relacionado à psoríase é fundida com sequências derivadas de um membro da família de proteína imunoglobulina. As proteínas de fusão

imunoglobulina da invenção podem ser incorporadas em composições farmacêuticas e administradas a um indivíduo para inibir uma interação entre um ligante (solúvel ou ligado a membrana) e uma proteína na superfície de uma célula (receptor), para desse modo suprimir transdução de sinal *in vivo*.

- 5 A proteína de fusão imunoglobulina pode ser usada para afetar a biodisponibilidade de um ligante cognato de um polipeptídeo de produto gênico relacionado à psoríase. Inibição de interação ligante/receptor pode ser útil terapeuticamente, tanto para tratar distúrbios proliferativos e diferenciativos quanto para modular (por exemplo, promover ou inibir) sobrevivência celular.
- 10 Uma modalidade preferida de uma proteína imunoglobulina quimérica é uma imunoglobulina deletada por domínio C_H1 ou "mimeticorpo" que apresenta um fragmento de polipeptídeo ativo interposto em uma região de estrutura modificada conforme ensinado em pedido copendente PCT WO/04002417. Além disso, as proteínas de fusão imunoglobulina da invenção podem ser usadas
- 15 como imunogênes para produzir anticorpos direcionados contra um polipeptídeo de produto gênico relacionado à psoríase em um indivíduo, para purificar ligantes e em ensaios de seleção para identificar moléculas que inibem a interação de receptores com ligantes.

Composições e Seus Usos

- 20 De acordo com a invenção, os antagonistas neutralizantes de produto gênico relacionado a antipsoríase, tais como anticorpos monoclonais, descritos neste relatório podem ser usados para inibir atividade de produto gênico relacionado a psoríase. Adicionalmente, tais antagonistas podem ser usados para inibir a patogênese ou psoríase e doenças inflamatórias
- 25 correlatas tratáveis a tal tratamento, que poderão incluir, mas sem se limitar aos mesmos, doenças reumáticas. O indivíduo a ser tratado poderá ser qualquer mamífero e é preferencialmente um primata, um animal de companhia que é um mamífero e mais preferencialmente um paciente humano. A quantidade de antagonista administrada variará de acordo com o propósito que
- 30 está sendo usada, e o método de administração.

Os antagonistas de gene relacionado a psoríase poderão ser administrados por qualquer número de métodos que resulta em um efeito em

tecido no qual atividade patológica é desejada ser impedida ou detida. Adicionalmente, os antagonistas de produto gênico relacionado à antipsoríase necessitam não estar presentes localmente para conferir um efeito sobre a atividade de produto gênico relacionado a psoríase, portanto, poderão ser

5 administrados em qualquer lugar que seja obtido o acesso a compartimentos corporais ou fluidos contendo produto gênico relacionado a psoríase. No caso de tecidos inflamados, malignos, ou de outra maneira comprometidos, esses métodos poderão incluir aplicação direta de uma formulação que contém os antagonistas. Tais métodos incluem administração intravenosa de

10 uma composição líquida, administração transdérmica de uma formulação líquida ou sólida, oral, administração tópica, ou administração intersticial ou interoperativa. Administração poderá ser afetada pela implantação de um dispositivo cuja função primária poderá não ser como um veículo de transferência de fármaco.

15 Em relação a anticorpos, a dosagem preferida é aproximadamente 0,1 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal (de forma geral, aproximadamente 10 mg/kg a 20 mg/kg). Se o anticorpo é para agir no cérebro, uma dosagem de aproximadamente 50 mg/kg a 100 mg/kg é usualmente apropriada. Geralmente, anticorpos parcialmente humanos e anticorpos totalmente

20 humanos apresentam uma meia-vida mais longa no corpo humano do que outros anticorpos. Consequentemente, o uso de dosagens menores e administração menos frequente é muitas vezes possível. Modificações, tal como lipidação, podem ser usadas para estabilizar anticorpos e acentuar absorção e penetração de tecido (por exemplo, no cérebro). Um método de lipidação

25 de anticorpos é descrito por Cruikshank e outros ((1997) *J. Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology* 14:193).

As moléculas de ácidos nucleicos antagonistas de produto gênico relacionado à psoríase podem ser inseridas em vetores e usadas como vetores de terapia genética. Vetores de terapia genética podem ser transfe-

30 ridos para um indivíduo mediante, por exemplo, injeção intravenosa, administração local (Patente dos Estados Unidos Nº 5.328.470), ou por meio de injeção estereotática (ver, por exemplo, Chen e outros (1994) *Proc. Natl. A-*

cad. Sci. USA 91:3054- 3057). A preparação farmacêutica do vetor de terapia gênica pode incluir o vetor de terapia gênica em um diluente aceitável, ou pode compreender uma matriz de liberação lenta em que o veículo de transferência gênica é embutido. Alternativamente, onde o vetor de transferência

5 gênica completa pode ser produzido intacto a partir de células recombinantes, por exemplo, vetores retrovirais, a preparação farmacêutica pode incluir uma ou mais células que produzem o sistema de transferência gênica.

As composições farmacêuticas podem ser incluídas em um recipiente, embalagem, ou distribuídas juntamente com instruções de administração.

10

Farmacogenômicos

Agentes, ou moduladores que apresentam um efeito estimulatório ou inibitório sobre atividade ou expressão de um polipeptídeo de produto gênico relacionado à psoríase conforme identificado por meio de um

15 ensaio de seleção descrito neste relatório descritivo, podem ser administrados a indivíduos para tratar (profilática ou terapeuticamente) distúrbios associados à atividade aberrante dos polipeptídeos. Em conjunto com tal tratamento, os farmacogenômicos (isto é, o estudo da relação entre um genótipo do indivíduo e que resposta do indivíduo para um composto ou fármaco

20 estranho do indivíduo, poderão ser considerados. Diferenças no metabolismo de produtos terapêuticos podem levar à severa toxicidade ou falha terapêutica alterando a relação entre dose e concentração sanguínea do fármaco farmacologicamente ativo. Desse modo, os farmacogenômicos do indivíduo permite a seleção de agentes eficazes (por exemplo, fármacos) para

25 tratamentos profiláticos ou terapêuticos baseados em uma consideração do genótipo do indivíduo. Tais farmacogenômicos podem adicionalmente ser usados para determinar dosagens apropriadas e regimes terapêuticos. Consequentemente, a atividade de um polipeptídeo de produto gênico relacionado a psoríase, expressão de um ácido nucleico de produto gênico relacionado a psoríase, ou teor de mutação de um gene de produto gênico relacionado a psoríase em um indivíduo pode ser determinado para desse modo se-

30 lecionar um agente ou agentes apropriados para tratamento terapêutico ou

profilático do indivíduo.

Farmacogenômicos lida com variações hereditárias clinicamente significativas na resposta a fármacos devido à disposição de fármaco alterada e ação anormal em pessoas afetadas. Ver, por exemplo, Linder (1997) *Clin. Chem.* 43(2):254-266. Em geral, dois tipos de condições farmacogenéticas podem ser diferenciadas. Condições genéticas transmitidas como um único fator que altera o modo de fármacos agir no corpo são referidas como "ação de fármaco alterada". Condições genéticas transmitidas como únicos fatores que alteram o modo do corpo agir em fármacos são referidas como "metabolismo de fármaco alterado". Essas condições farmacogenéticas podem ocorrer como as defeitos raros ou como polimorfismos. Por exemplo, deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é uma enzimopatia comum herdada em que a complicação clínica principal é hemólise após ingestão de fármacos oxidantes (antimaláricos, sulfonamidas, analgésicos, nitrofuranos) e consumo de feijão-fava.

Como uma modalidade ilustrativa, a atividade de enzimas que metabolizam fármacos é um determinante majoritário tanto de intensidade quanto duração de ação de fármaco. A descoberta de polimorfismos genéticos de enzimas que metabolizam fármaco (por exemplo, enzimas N-acetiltransferase 2 (NAT 2) e citocromo P450 CYP2D6 e CYP2C19) tem proporcionado uma explicação como porque alguns pacientes não obtêm os efeitos esperados do fármaco ou mostram resposta exagerada do fármaco e grave toxicidade após tomar a dose-padrão e segura de um fármaco. Esses polimorfismos são expressos em dois fenótipos na população, o metabolizador extensivo (EM) e metabolizador pobre (MP). A prevalência de PM é diferente entre populações diferentes. Por exemplo, a codificação genética de CYP2D6 é altamente polimórfica e diversas mutações são identificadas em MP, as quais levam à ausência de CYP2D6 funcional. Metabolizadores pobres de CYP2D6 e CYP2C19 muito frequentemente experimentam resposta exagerada de fármaco e efeitos colaterais quando recebem doses-padrão. Se um metabólito é a metade terapêutica ativa, uma PM mostrará nenhuma resposta terapêutica, conforme demonstrado em relação ao efeito analgésico

de codeína mediada por sua morfina metabólita formada por CYP2D6. Os outros extremos são os chamados metabolizadores ultrarrápidos que não respondem às doses-padrão. Recentemente, a base molecular de metabolismo ultrarrápido identificou-se ser devido à amplificação genética de CYP2D6.

5 Desse modo, a atividade de um polipeptídeo de produto gênico relacionado à psoríase, expressão de um ácido nucleico que codifica o polipeptídeo, ou teor de mutação de um gene que codifica o polipeptídeo em um indivíduo pode ser determinado para desse modo selecionar agente(s) apropriado(s) para tratamento terapêutico ou profilático do indivíduo. Além
10 disso, estudos farmacogenéticos podem ser usados para aplicar genótipos de alelos polimórficos que codificam enzimas metabolizantes de fármaco para a identificação de um fenótipo de responsividade por fármaco do indivíduo. Esse conhecimento, quando aplicado para dosagem ou seleção de fármaco, pode evitar reações adversas ou falha terapêutica e, desse modo,
15 acentuar eficiência terapêutica ou profilática quando tratando um indivíduo com um modulador de atividade ou expressão do polipeptídeo, tal como um modulador identificado por um dos ensaios de seleção exemplares descritos neste relatório.

Métodos de Tratamento

20 A presente invenção proporciona tanto métodos profiláticos quanto terapêuticos de tratamento de um indivíduo sob risco de (ou suscetível a) um distúrbio ou que apresenta um distúrbio associado à expressão aberrante ou atividade de um polipeptídeo de produto gênico relacionado à psoríase e/ou em que o polipeptídeo de produto gênico relacionado à psoríase está envolvido.
25

 A presente invenção proporciona um método para modular ou tratar pelo menos uma doença ou condição relacionada a produto gênico relacionado à psoríase, em uma célula, tecido, órgão, animal, ou paciente, conforme conhecido no estado da técnica ou como descrito neste relatório,
30 usando pelo menos um antagonista de produto gênico relacionado à psoríase.

 Composições de antagonista de produto gênico relacionado à psoríase poderão encontrar uso terapêutico no tratamento de psoríase ou

condições relacionadas, tais como asma, escleroderma, fibrose pulmonar idiopática.

A presente invenção também proporciona um método para modular ou tratar pelo menos uma doença imune correlata, em uma célula, tecido, órgão, animal, ou paciente incluindo, mas não limitado a, pelo menos

5 uma dentre artrite reumatóide, artrite reumatoide juvenil, artrite reumatoide juvenil de início sistêmica, artrite psoriática, espondilite anquilosante, úlcera gástrica, artropatias soronegativas, osteoartrite, doença inflamatória dos intestinos, colite ulcerativa, lúpus eritematoso sistêmico, síndrome

10 antifosfolípidios, iridociclite/uveíte/neurite óptica, fibrose pulmonar idiopática, vasculite sistêmica/granulomatose de Wegener, sarcoidose, procedimentos de orquite vasectomia de reversão, doenças alérgicas/atópicas, rinite alérgica, eczema, dermatite alérgica de contato, conjuntivite alérgica, pneumonite de hipersensibilidade, transplantes, rejeição do órgão de

15 transplante, doença de enxerto-versus-hospedeiro, síndrome de resposta inflamatória sistêmica, síndrome de sepse, sepse gram-positiva, sepse gram-negativa, sepse de cultura negativa, sepse fúngica, febre neutropênica, urosepse, meningococcemia, trauma/hemorragia, queimaduras, exposição à radiação ionizante, pancreatite aguda, síndrome do distúrbio respiratório em

20 adulto, artrite reumatóide, hepatite induzida por álcool, patologias inflamatórias crônicas, sarcoidose, patologia de Crohn, anemia drepanocítica, diabetes, nefrose, doenças atópicas, reações de hipersensibilidade, rinite alérgica, febre do feno, rinite perenial, conjuntivite, endometriose, urticária, anafilaxia sistêmica, dermatite, anemia perniciosa,

25 doença hemolítica, trombocitopenia, rejeição a enxerto de qualquer órgão ou tecido, rejeição a transplante de rim, rejeição a transplante de coração, rejeição a transplante de fígado, rejeição a transplante de pâncreas, rejeição a transplante de pulmão, rejeição a transplante de medula óssea (BMT), rejeição a aloenxerto da pele, rejeição a transplante de cartilagem, rejeição a

30 enxerto ósseo, rejeição a transplante de intestino delgado, rejeição a implante fetal do timo, rejeição a transplante de paratireóide, rejeição a xenoenxerto de qualquer órgão ou tecido, rejeição a aloenxerto, reações anti-receptoras de hipersensibilidade, doença de Graves, doença de

Raynaud, diabetes resistente à insulina tipo B, miastenia grave, citotoxicidade mediada por anticorpos, reações de hipersensibilidade tipo III, lúpus eritematoso sistêmico, síndrome de POEMS (polineuropatia, organomegalia, endocrinopatia, gamopatia monoclonal, e síndrome de alterações da pele),
 5 síndrome antifosfolipídica, pênfigo, escleroderma, doença de tecido conectivo mista, doença idiopática de Addison, diabetes melito, hepatite crônica ativa, cirrose biliar primária, vitiligo, vasculite, síndrome de cardiectomia pós-MI, hipersensibilidade tipo IV, dermatite de contato, pneumonite de hipersensibilidade, rejeição a aloenxerto, granulomas devido a organismos
 10 intracelulares, sensibilidade a fármaco, metabólica/idiopática, doença de Wilson, hemacromatose, deficiência de alfa-1-antitripsina, retinopatia diabética, tireoidite de Hashimoto, osteoporose, avaliação do eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal, cirrose biliar primária, tireoidite, encefalomielite, caquexia, fibrose cística, linfo-histiocitose hematofagocítica familiar, condições derma-
 15 tológicas, psoríase, alopecia, síndrome nefrótica, nefrite, nefrite glomerular, insuficiência renal aguda, hemodiálise, uremia, toxicidade, pré-eclâmpsia, terapia de okt3, terapia anti-cd3, terapia de citocina, quimioterapia, terapia de radiação (por exemplo, incluindo, mas sem se limitar à astenia, anemia, caquexia, e similares), intoxicação crônica por salicilato, e similares. Ver, por
 20 exemplo, o Manual *Merck*, Edições 12^a-17^a, *Merck & Company, Rahway, NJ* (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), *Pharmacotherapy Handbook*, Wells e outros, eds., Segunda Edição, Appleton e Lange, *Stamford, Conn.* (1998, 2000), cada um totalmente incorporado como referência.

A presente invenção também proporciona um método para modular ou tratar pelo menos uma doença maligna em uma célula, tecido, órgão, animal ou paciente, incluindo, mas sem não limitado a, pelo menos uma
 25 dentre: leucemia, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (ALL), células B, células T ou FAB ALL, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia promielocítica aguda (APL), leucemia mielocítica crônica (CML), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia de células pilosas, síndrome mielodisplásica
 30 (MDS), um linfoma, doença de Hodgkin, um linfoma maligno, linfoma não-Hodgkin, linfoma de Burkitt, mieloma múltiplo, sarcoma de Kaposi, carcino-

ma colorretal, carcinoma pancreático, carcinoma nasofaríngeo, histiocitose maligna, síndrome paraneoplásica/hipercalcemia de malignidade, tumores sólidos, adenocarcinomas, sarcomas, melanoma maligno, hemangioma, doença metastática, reabsorção óssea relacionada a câncer, dor óssea relacionada a câncer, e similares.

Distúrbios caracterizados por expressão aberrante ou atividade dos polipeptídeos de produto gênico relacionado à psoríase são adicionalmente descritos em qualquer outro lugar nessa descrição.

1. Métodos Profiláticos

Em um aspecto, a invenção proporciona um método de pelo menos substancialmente prevenir em um indivíduo, uma doença ou condição associada a uma expressão aberrante ou atividade de um polipeptídeo de produto gênico relacionado à psoríase, administrando ao indivíduo um agente que modula expressão ou pelo menos uma atividade do polipeptídeo. Indivíduos sob risco de uma doença que é causada ou contribuída por expressão aberrante ou atividade de um produto gênico relacionado à psoríase podem ser identificados mediante, por exemplo, qualquer ou uma combinação de ensaios diagnósticos ou prognósticos conforme descritos neste relatório. Administração de um agente profilático pode ocorrer antes da manifestação de sintomas característicos da aberração, de tal modo que uma doença ou distúrbio seja impedida ou, alternativamente, retardada em sua progressão. Dependendo do tipo de aberração, por exemplo, um agente agonista ou antagonista pode ser usado para tratar o indivíduo. O agente apropriado pode ser determinado com base em ensaios de seleção descritos neste relatório.

2. Métodos Terapêuticos

Um outro aspecto da invenção refere-se a métodos de modular expressão ou atividade de gene relacionado à psoríase ou produto gênico para propósitos terapêuticos. O método modulador da invenção envolve contatar uma célula com um agente que modula uma ou mais das atividades do polipeptídeo. Um agente que modula atividade pode ser um agente conforme descrito neste relatório, tal como um ácido nucleico ou uma proteína, um ligante cognato que ocorre naturalmente do polipeptídeo, um peptídeo, um

peptídomimético, ou outra molécula pequena. Em uma modalidade, o agente estimula uma ou mais das atividades biológicas do polipeptídeo. Em uma outra modalidade, o agente inibe uma ou mais das atividades biológicas do gene relacionado à psoríase ou polipeptídeo de produto gênico. Exemplos de tais agentes inibitórios incluem moléculas de ácido nucleico antissentido e anticorpos e outros métodos descritos neste relatório. Esses métodos moduladores podem ser realizados *in vitro* (por exemplo, mediante cultura da célula com o agente) ou, alternativamente, *in vivo* (por exemplo, administrando o agente a um indivíduo). Como tal, a presente invenção proporciona métodos de tratar um indivíduo afligido com uma doença ou distúrbio caracterizado por expressão aberrante ou atividade de um polipeptídeo de produto gênico relacionado à psoríase. Em uma modalidade, o método envolve administrar um agente (por exemplo, um agente identificado por um ensaio de seleção descrito neste relatório), ou combinação de agentes que modulam (por exemplo, induzem ou inibem) expressão ou atividade. Inibição de atividade é desejável em situações em que atividade ou expressão é anormalmente alta ou induz (*up-regulated*) e/ou em que diminuição de atividade provavelmente apresenta um efeito benéfico.

Embora tendo descrito a invenção em termos gerais, as modalidades da invenção serão adicionalmente descritas nos seguintes exemplos que não devem ser interpretados como limitando o escopo das reivindicações.

EXEMPLO 1: Análise de Amostra Usando Microarranjos de Ácidos Nucleicos

O projeto de estudo (Protocolo C0379T02) foi um estudo duplo-cego fase I controlado com placebo, para a avaliação de segurança e farmacologia de administrações subcutâneas simples de anticorpo monoclonal humano a IL-12 (CNT01275) em indivíduos com psoríase vulgar moderada a grave. Esse estudo foi conduzido em múltiplos centros na Flórida, Nova Jérsei e Pensilvânia. Vinte e um indivíduos foram randomizados para tratamento ativo ou com placebo em 1 de 4 grupos com doses escalonadas sequenciais (0,3mg/kg, 0,75 mg/kg, 1,5 mg/kg ou 3,0 mg/kg) nos três locais. Cada indivíduo recebeu uma única injeção subcutânea e permaneceu na

clínica por pelo menos 8 horas após administração do agente sob estudo. Os indivíduos retornaram para visitas periódicas de acompanhamento durante um período de 24 semanas e se exigiu deles pelo menos 4 semanas de acompanhamento. Os indivíduos participaram por até 28 semanas, incluindo 4 semanas antes da administração do agente de teste. Indivíduos (idades de 18-65) com psoríase em placas moderada a grave envolvendo > 3% de área da superfície do corpo (BSA) e que gozavam de modo geral de boa saúde foram admitidos no estudo.

Amostras de biópsia da pele foram tomadas de indivíduos sob experiência 24 horas antes (linha de referência) e uma semana após tratamento. Uma lesão-alvo de biópsia representativa, localizada no tronco ou extremidades com derme e tecido SC adequados, foi identificada pelo investigador para ser usada em análises de biópsia. Uma biópsia com punção de 6 mm foi obtida na linha de referência e uma semana após administração de agente de teste. Houve 4 amostras de 2 não-responsivos tanto no dia 0 quanto na 1ª semana. Essas amostras foram excluídas da análise. Os dados descritos abaixo são baseados em amostras de pacientes que mostraram melhora em sua condição psoriática após tratamento com o anti-IL-12p40.

RNA total foi isolado dessas biópsias de pele utilizando kit *RNeasy* (Qiagen, Valência, CA). A qualidade do RNA foi avaliada usando o *BioAnalyzer* (Agilent, South Plainfield, Nova Jérsei). Somente RNA de alta qualidade é usado para análise de microarranjos que contém 8.160 clones únicos de cDNA humano coletados de consórcio IMAGE e *Incyte Genomics* (Santa Clara, CA). Amplificação de RNA, síntese e marcação de sondas, hibridização do chip de cDNA e lavagem foram realizadas conforme descrito anteriormente (Salunga e outros, 1999. In: M. Schena (Ed.), *DNA microarrays a practical approach*, Oxford University Press, Oxford, pp. 121-137). Um Scanner de Imagens Agilent foi utilizado para escanear as lascas de cDNA (Palo Alto, CA). Intensidade de fluorescência para cada aspecto do arranjo foi obtida usando software *ImaGene* (BioDiscovery, Los Angeles, CA).

Um total de 24 amostras foram analisadas de 5 grupos de tratamento (placebo, 0,3 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1,5 mg/kg e 3,0 mg/kg) e 2 pontos

de tempo (linha de referência e 1ª semana) desses grupos como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Amostras de Biópsias de Tecido Para Análise de Microarranjos

Biópsia	Placebo	0,3 mg/kg	0,75 mg/kg	1,5 mg/kg	3,0 mg/kg
Dia 0	4	3	3	1	2
1ª Semana	4	2	2	1	2

Processamento e Análise de Dados

5 Usando *software GeneSpring®* versão 6.0 (*Silicon Genetics, Redwood City, CA*), a intensidade média para cada aspecto foi adicionalmente normalizada por todas as amostras. Normalização chip a chip foi realizada dividindo a intensidade média de cada clone pela intensidade média de uma lasca. A intensidade de cada clone foi então normalizada com a intensidade média desse clone no grupo de controle. Os valores da linha de

10 referência neste estudo foram a média de todas as amostras no dia 0 antes do tratamento. A comparação estatística de grupos tratados com anti-IL-12p40 vs placebo em cada grupo de dosagem (exceto o de 1,5 mg/kg por ter somente duas amostras) foi efetuada por um ANOVA de uma via ($P < 0,05$)

15 sob o $\log_2$ de intensidade normalizada transformada.

Subsequentemente, análise de pares estatísticos também usou um valor de p de 0,05. Esses parâmetros resultam na possibilidade de que 350-400 genes poderiam ser identificados casualmente fora do universo de genes possíveis. Entretanto, os genes identificados parecem crivelmente

20 relacionados com a doença, porque seus padrões de expressão são consistentes com resposta clínica; sendo relativamente constantes nas amostras de pré-tratamento, inibem-se após tratamento, e, finalmente, muitos eram genes de resposta imune conhecidos, por exemplo, IL1F5, IL1F9, IL1RN, IL8, e foram anteriormente associados a condições inflamatórias. Assim, a-

25 credita-se que eles sejam biomarcadores genéticos autênticos relacionados à psoríase.

Resultados dos Microarranjos

As Tabelas 2A-F listam os 26 genes que mostraram alterações significativas mediante teste estatístico em comparação com pelo menos um

- grupo de dosagem e alteração pelo menos 1,4 vez em comparação com um segundo grupo de dosagem. Os 26 genes listados representam um painel de genes relacionados à psoríase, subdivididos em 6 categorias funcionais, que sofrem modulação de expressão indicativa da resolução de psoríase e me-
- 5 hora em termos de estrutura e função de pele normal. Apenas os genes identificados na 1ª semana são relatados; os genes que satisfazem os mesmos critérios mas provenientes das amostras do dia 0 foram excluídos.

Tabela 2. Lista de genes significativamente alterados por suas categorias funcionais

Tabela 2A. Citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento

Gene	Número de acesso	Nome	Descrição	0,3 mg/kg	0,75 mg/kg	1,5 mg/kg	3,0 mg/kg
1	NM_012275	IL1F5	família de interleucina 1, membro 5 (delta), IL1HY1	-1,90	-2,37	-1,92	-1,95
2	NM_019618	IL1F9	família de interleucina 1, membro 9 (épsilon), IL1H1	-2,12	-2,27	-1,43	-1,90
3	NM_000577	IL1RN	antagonista de receptores de interleucina 1, IL1RA	-1,86	-2,16	-1,72	-1,67
4	NM_000584	IL8	interleucina 8, CXCL8	-1,63	-1,61	-1,79	-1,66
5	NM_001511	CXCL1	ligante 1 de quimiocina (<i>motif C-X-C</i>), GRO1	-2,29	-2,00	-1,57	-1,72
6	NM_002983	CCL3	ligante 3 de quimiocina (<i>motif C-C</i>), MIP-1-alfa	-1,60	-1,75	-1,42	1,17

Tabela 2B. Proteases

Gene	Número de Nome	Descrição	0,3 mg/kg	0,75 mg/kg	1,5 mg/kg	3,0 mg/kg
	acesso					
7	NM_000386	BLMH bleomicina hidrolase	2,12	1,52	1,20	1,62
8	NM_015596	KLK13 <i>kallikrein</i> 13,	-1,37	-2,07	-1,68	-1,28
9	NM_000930	PLAT ativador de plasminogênio tecidual	-1,46	-2,05	1,20	-1,70

Tabela 2C. Inibidores de protease

Gene	Número de acesso	Nome	Descrição	0,3 mg/kg	0,75 mg/kg	1,5 mg/kg	3,0 mg/kg
10	NM_002974	SER- PINB4	inibidor de serina (ou cisteína) proteína- se, clade B (ovalbumina), membro 4	-2,79	-4,67	-2,20	-1,61
11	NM_006919	SER- PINB3	inibidor de serina (ou cisteína) proteína- se, clade B (ovalbumina), membro 3	-2,21	-2,92	-1,15	1,64
12	NM_002638	PI3	inibidor de protease 3, derivado da pele (SKALP)	-1,29	-2,13	-1,45	-1,18
13	NM_012397	SER- PINB13	inibidor de serina (ou cisteína) proteína- se, clade B (ovalbumina), membro 13	-1,08	-1,78	-1,45	-1,20
14	NM_000100	CSTB	cistatina B (estefina B)	-1,65	-2,26	-2,30	-1,39

Tabela 2D. Moléculas estruturais e de adesão

Gene	Número de acesso	Nome	Descrição	0,3 mg/kg	0,75 mg/kg	1,5 mg/kg	3,0 mg/kg
15	NM_003285	TNR	tenascina R (restritina, janusina)	1,20	1,74	1,42	-1,27
16	NM_004004	GJB2	proteína de junção de intervalo beta 2 (conexina 26)	-2,77	-3,40	-1,94	-1,66
17	NM_005987	SPRR1A	pequena proteína rica em prolina 1A de <i>Homo sapiens</i>	-1,97	-2,54	-3,72	-1,03
18	NM_005797	EVA1	antígeno epitelial 1 semelhante a V	-1,59	-1,71	-1,34	-1,65

Tabela 2E. Metabolismo de lipídeos e cálcio

Gene	Número de acesso	Nome	Descrição	e	0,75 mg/kg	1,5 mg/kg	3,0 mg/kg
19	NM_000700	ANXA1	anexina A1, lipocortina I	-3,24	-2,34	-1,40	-2,26
20	NM_005564	LCN2	lipocalina 2, Neutrófilo lipocalina associada a gelatinase (NGAL)	-1,92	-2,07	-1,90	-1,46
21	NM_001444	FABP5	proteína de ligação de ácidos graxos 5 (associada à psoríase), E-FABP, PA-FABP	1,01	-1,93	-1,43	-1,20

Tabela 2E. -continuação-

Gene	Número de acesso	Nome	Descrição	0,3 mg/kg	0,75 mg/kg	1,5 mg/kg	3,0 mg/kg
22	NM_024422	DSC2	desmocolina 2 membro 2 da família de canais de clo-	-2,70	-3,30	-2,99	-2,07
23	NM_006536	CLCA2	reto ativados por cálcio	-1,86	-2,84	-2,46	-1,89

Tabela 2F. Receptores

Gene	Número de acesso	Nome	Descrição	0,3 mg/kg	0,75 mg/kg	1,5 mg/kg	3,0 mg/kg
24	NM_004431	EPHA2	receptor de efrina A2, receptor cinase	-1,30	-1,50	-1,58	-1,27
25	NM_013230	CD24	antígeno CD24 família de veículos solutos 6 (transpor-	-1,51	-2,03	-1,31	-1,41
		S-	tadores de neurotransmissores), mem-				
26	NM_007231	LC6A14	bro 14	-2,08	-1,80	-1,92	-1,57

Citocinas e quimiocinas

Embora se soubesse que muitas citocinas Th1, tais como TNF- α e IFN- γ , são induzidas em pele com lesão psoriática (2,3), tratamento com anti-IL-12p40 inibiu seletivamente três membros menos conhecidos da família IL-1: IL1F5 (IL-1 delta) e IL1F9 (IL-1 épsilon), e IL1RN (antagonista de receptores de IL-1 que é altamente homólogo a IL1F5) na 1ª semana. Embora todas essas citocinas IL-1 tivessem sido relatadas ser substancialmente induzidas em pele psoriática (Debets e outros, 2001. *J Immunol.* **167**(3)1440-6; Zhou e outros, *Physiol Genomics*, 2003. **13**(1). 69-78), a presente invenção mostra que elas estão na primeira onda de citocinas inibidas como resultado de terapia, semanas à frente de melhora clínica visível. O fato de que IL1F5 e IL1F9 são conhecidas por serem preferencialmente expressas em células epiteliais, em particular por queratinócitos, indica que essas duas citocinas poderão desempenhar um papel maior e mais específico em patogênese de psoríase.

Similarmente, dentre muitas quimiocinas que se verificam ser superexpressas em lesões psoriáticas (Zhou e outros, 2003, supra), tratamento com anti-IL-12p40 inibiu seletivamente IL-8 e CXCL1 (GRO1), ambos quimiotratantes potenciais de neutrófilos. Uma vez que superprodução de neutrófilos quimiocinas e o resultado de infiltração neutrófila são marcas moleculares e celulares de psoríase, espera-se que tratamento eficaz reduzisse a produção dessas quimiocinas. Surpreendentemente, quimiocina CCL3 de macrófagos foi também inibida por anti-IL-12p40. O envolvimento de CCL3 em psoríase não se encontra relatado, embora tenha se verificado ser induzido nas PBMCs de pacientes com dermatite atópica (AD) (Hatano e outros, 1999. *Clin Exp Immunol*, **117**(2). 237-43), uma doença que compartilha muitas características clínicas com psoríase.

Proteases da pele e inibidores de proteases como mediadores inflamatórios

Algumas serina proteases e seus inibidores têm sido relatados ser associados à psoríase. Observou-se inibição desses grupos de genes. Por exemplo, dois membros da família de *kallikreins* (KLK) de serina proteases, KLK6 e KLK 13, foram inibidos pelo tratamento com anti-IL-12p40. As

KLKs, que são codificadas por agrupamentos de 15 genes no cromossomo 19q13, são envolvidas na diferenciação terminal de queratinócitos em corneócitos (Lu, J. e outros, 2005. *J Invest Dermatol.* **124**(4). 778-85). Pelo menos algumas KLKs são negativamente reguladas por membros da família de inibidores de serina proteínases (SERPINs). Interessantemente, quatro membros de SERPINs, SERPINB3, B4, B5 e B13 dos SERPINs, foram inibidos por anti-IL-12p40. Tomados juntamente, a rede KLK-SERPIN é intimamente envolvida na patogênese de psoríase.

Outro exemplo de uma protease da pele é ativador de plasminogênio tecidual (PLAT), que era um marcador comum em epiderme psoriática, epiderme durante reparo de ferimento e queratinócitos em cultura (Jensen, PJ e outros, 1990. *J Invest Dermatol* **95**(5). 13S-14S). PLAT foi inibido por tratamento com anti-IL-12p40.

Outro exemplo de um inibidor de protease específico à pele é PI3, ou inibidor de protease 3 derivado da pele ou precursor de elafina. PI3 é uma proteína epitelial de defesa de hospedeiro que está ausente em pele normal, mas é altamente induzida em queratinócitos de pele inflamada, tal como psoríase (Pol A e outros, 2003 *J Invest Dermatol* **120**(2). 301-7). Sabia-se que expressão de PI3 poderia ser induzida por soro ou TNF- α e suprimida por retinoides, ditranol e inibidores de cinase p38 MAP. A presente invenção revela que sua expressão pode também ser inibida por anti-IL-12p40.

Dentre os genes que foram induzidos como resultado de tratamento com anti-IL-12p40, o mais consistente é bleomicina hidrolase (BLMH). Ela é uma cisteína peptidase citoplasmática. Polimorfismo desse gene foi associado a doenças neurodegenerativas, notavelmente doença de Alzheimer (Montoya, SE e outros, 1998. *Nat Genet* **18**(3). 211-2). Nenhum papel de BLMH em psoríase jamais foi relatado.

Moléculas estruturais e de adesão

Limpeza de lesões psoriáticas envolve muitas mudanças estruturais, e, na verdade, foram detectadas muitas alterações genéticas de moléculas integrais aos componentes dérmicos e epidérmicos. Por exemplo,

GJB2 (Conexina26), um componente de junção de intervalo durante ambos os estágios iniciais e posteriores de diferenciação de queratinócitos, foi inibido por tratamento com anti-IL12p40. GJB2 foi consistentemente detectado entre queratinócitos das camadas basais e granulares na periferia de placas psoriáticas e em todas as camadas de epiderme psoriática plenamente desenvolvida. Contudo, nenhuma ou uma quantidade mínima de GJB2 tinha sido anteriormente observada tanto em regiões de controle quanto em regiões não-lesionadas de epiderme psoriática (Labarthe, MP e outros, 1998. *J Invest Dermatol* **111**(1). 72-6).

Devido à diferenciação anormal de queratinócitos em lesões por psoríase, marcadores de diferenciação iniciais, tais como proteínas ricas em prolina (SPRR1A), são superexpressos, enquanto marcadores de diferenciação tardios, tais como loricrina (LOR), são abolidos (Lizuka, H e outros, 2004. *J Dermatol* **31**(4). 271-6). O inverso dessa tendência foi detectado somente uma semana após o tratamento com anti-IL-12p40, uma forte indicação de melhora clínica.

Um dos melhores marcadores de resolução clínica conhecido e possivelmente o mais confiável foi a redução de queratina 16 (KRT16) (Holland, DB e outros, 1989. *Br J Dermatol* **120**(1). 9-19). Tanto KRT16 quanto queratina 14 foram detectadas como sendo suprimidas no estágio inicial de tratamento por meio de anti-IL-12p40.

Proteínas do metabolismo de lipídeos como mediadores imunes

Anexina I (lipocortina I), que é uma proteína de ligação de cálcio e fosfolípídeo que é envolvida na regulação de diferenciação e proliferação de queratinócitos epidérmicos e apresenta maior expressão em epiderme psoriática do que em epiderme normal (Lizuka, H. 2004, supra), foi detectada como sendo inibida por anti-IL-12p40.

Outro importante mediador imune que foi detectado como sendo inibido por anti-IL12p40 é Neutrófilo lipocalina associada à gelatinase (NGAL, Lipocalina-2, LCN2). Acredita-se que proteína LCN2 ligue-se a pequenas substâncias lipófilas, tais como lipopolissacarídeos derivados de bactérias (LPS) e formilpeptídeos, e poderão funcionar como um modulador

de inflamação (Flo, THS e outros, 2004. *Nature* 432: 917-921). Adicionalmente, LCN é também um marcador para diferenciação desregulada de queratinócitos em pele humana (Mallbris, L e outros, 2002. *Exp Dermatol* 11(6). 584-91).

- 5 Proteína de ligação de ácidos graxos associada à psoríase (FABP5 ou PA-FABP) é outro marcador que é altamente induzido em pele psoriática (Madsen, P. e outros, 1992. *J Invest Dermatol* 99(3). 299-305), mas inibido por tratamento com anti-IL-12p40. Relatou-se anteriormente que quando se trata com esteroides tópicos pele psoriática lesionada, as mudanças
- 10 nos padrões de expressão de PI3 e FABP5 ocorrem de maneira consistente com eventos biológicos celulares conhecidos durante regressão da lesão psoriática (Kuijpers, Al e outros, 1997. *Acta Derm Venereol* 77(1). 14-9).

Mudanças na expressão de genes detectadas por RT-PCR

- Com amostras de RNA limitadas deixadas após análise de mi-
- 15 croarranjos, análise Taqman foi realizada em alguns dos genes na Tabela 2. Um micrograma de RNA total no volume de 50 ul foi convertido em cDNA na presença de Transcriptase Reversa *MultiScribe*. A reação foi realizada incubando por 10 minutos a 25°C seguida de 30 minutos a 48°C. Transcriptase Reversa foi inativada a 95°C por 5 minutos. Vinte nanogramas de cDNA por
- 20 reação foram usados em PCR em tempo real com o sistema ABI 7900 (*Foster City, Califórnia*). Na presença de DNA polimerase AmpliTaq Gold (*AB/biosystem, Foster City, Califórnia*), a reação foi incubada por 2 minutos a 50°C seguida de 10 minutos a 95°C. Em seguida, a reação processou-se por 40 ciclos a 15 segundos, 95°C e 1 minuto, 60°C por ciclo.

- 25 O gene preparatório GAPDH (gliceraldeídos-3-fosfato desidrogenase) foi usado para normalizar expressão genética.

- As Figuras 1A-D mostram o padrão de expressão de genes de BLMH (A), IL1F5 (B), IL-8 (C) e PLAT (D) detectado por Taqman que geralmente confirma as mudanças observadas na expressão relativa desses ge-
- 30 nes específicos calculadas usando a análise de microarranjos.

EXEMPLO 2: Análise Taqman de um segundo grupo de psoríases

O estudo (C0379T04) foi um estudo paralelo de fase II, randomi-

zado, duplo-cego, controlado com placebo, em regime de doses únicas e múltiplas, com administração subcutânea (SC) de CNTO 1275 em indivíduos com psoríase moderada a grave. CNTO1275 é um anticorpo monoclonal totalmente humano específico à subunidade p40 de IL-12 e IL-23 humanas.

- 5 Esse estudo consiste em 5 grupos de indivíduos que receberam doses únicas ou múltiplas de administrações subcutâneas (SC) de CNTO 1275 ou placebo conforme descrito abaixo:

Grupo I: CNTO 1275, 45 mg, no 1º dia (semana 0) e placebo na 1ª, 2ª e 3ª semanas

- 10 Grupo II: CNTO 1275 90mg, no 1º dia (semana 0) e placebo na 1ª, 2ª e 3ª semanas

Grupo III: CNTO 1275 45mg, no 1º dia (semana 0) e na 1ª, 2ª e 3ª semanas

Grupo IV: CNTO 1275 90mg, no 1º dia (semana 0) e na 1ª, 2ª e 3ª semanas

Grupo V: Placebo, no 1º dia (semana 0) e na 1ª, 2ª e 3ª semanas

- 15 Uma lesão-alvo representativa, localizada no tronco ou extremidades com derme e tecido SC adequados, foi identificada pelo investigador do estudo para análise de biópsia. Uma biópsia com punção de 4 mm foi obtida da lesão-alvo pré-identificada na linha de referência e 12 semanas após administração de agente de estudo. RNA total foi obtido das amostras
- 20 de biópsia utilizando um *minikit RNeasy* (Qiagen, Inc., Valência, CA). A qualidade do RNA foi verificada com o BioAnalisador *Agilent 2100* (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). No total, 39 amostras de RNA (como listado na Tabela 3) foram usadas para microarranjo de DNA.

Tabela 3. Número de amostras em cada grupo de doses

Tratamento/Tempo	Dia 0	Semana 12	Total
90 mg de Respondedores combinados (90 mg de R)	7	6	13
45 mg de Respondedores combinados (45 mg de R)	3	2	5
Não-respondedores (NR)	7	3	10
Placebo	6	5	11
Total	23	16	39

RNA total foi isolado dessas biópsias de pele utilizando kit *RNeasy* (Qiagen, Valência, CA). A qualidade do RNA foi avaliada usando o *BioAnalyzer* (Agilent, South Plainfield, Nova Jérsei). Somente RNA de alta qualidade é usado para análise de microarranjos que contém 8.160 clones únicos de cDNA humano coletados de consórcio IMAGE e *Incyte Genomics* (Santa Clara, CA). Amplificação de RNA, síntese e marcação de sondas, hibridização de lascas de cDNA e lavagem foram realizadas conforme descrito anteriormente (Salunga e outros, 1999. In: M. Schena (Ed.), *DNA microarrays a practical approach*, Oxford University Press, Oxford, pp. 121-137). Um escaneador de Imagens *Agilent* foi utilizado para escanear as lascas de cDNA (Palo Alto, CA). Intensidade de fluorescência para cada aspecto do arranjo foi obtida usando *software ImaGene* (BioDiscovery, Los Angeles, CA).

Usando *software GeneSpring*[®] versão 6.0 (*Silicon Genetics*, Redwood City, CA), a intensidade média para cada aspecto foi adicionalmente normalizada por todas as amostras. Normalização lasca a lasca foi realizada dividindo a intensidade média de cada clone pela intensidade média de uma lasca. A intensidade de cada clone foi então normalizada com a intensidade média desse clone no grupo de controle. Os valores da linha de referência neste estudo foram a média de todas as amostras no dia 0 antes do tratamento. A comparação estatística de grupos tratados com anti-IL-12p40 vs placebo em cada grupo de dosagem foi efetuada por um ANOVA de uma via ($P < 0,05$) sob o $\log_2$ de intensidade normalizada transformada.

Subsequentemente, análise de pares estatísticos também usou um valor de p de 0,05. Esses parâmetros resultam na possibilidade de que 350-400 genes poderiam ser identificados casualmente fora do universo de genes possíveis. Entretanto, os genes identificados parecem crivelmente relacionados com a doença, porque seus padrões de expressão são consistentes com resposta clínica; sendo relativamente constantes nas amostras de pré-tratamento, inibem-se após tratamento, e, finalmente, muitos eram genes de resposta imune conhecidos, por exemplo, PBEF, S100A11 e IL4R, e foram anteriormente associados a condições inflamatórias. Assim, credi-

ta-se que eles sejam biomarcadores genéticos autênticos relacionados à psoríase.

Resultados dos Microarranjos

- 5 As Tabelas 4A-E listam os 10 genes que mostraram alterações significativas mediante teste estatístico em comparação com pelo menos um grupo de dosagem e alteração pelo menos 1,5 vez em comparação com um segundo grupo de dosagem. Os 10 genes listados representam um painel de genes relacionados à psoríase, subdivididos em 5 categorias funcionais, que sofrem modulação de expressão indicativa da resolução de psoríase e me-
- 10 lhora em termos de estrutura e função de pele normal. Apenas os genes identificados na 12ª semana são relatados; os genes que satisfazem os mesmos critérios mas provenientes das amostras do dia 0 foram excluídos.

Tabela 4. Lista de genes significativamente alterados em relação à referência por suas categorias funcionais

15 Tabela 4A. Citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento

Gene	Número de acesso	Nome	Descrição	90 mg de R	Placebo
27	NM_005746	PBEF	fator de aumento de colônias de pré-células B	-1,88	1,06
28	NM_001953	ECGF1	Fator de crescimento de células endoteliais 1 (derivado de plaquetas)	-1,57	-1,17

Tabela 4B. Proteases

Gene	Número de acesso	Nome	Descrição	90 mg de R	Placebo
29	NM_002776	KLK10	<i>kallikrein 10</i>	-2,03	1,05

Tabela 4C. Moléculas estruturais e de adesão

Gene	Número de acesso	Nome	Descrição	90 mg de R	Placebo
30	NM_006121	KRT1	queratina 1 (hiperqueratose epidermolítica)	-2,89	1,14
31	NM_005557	KRT16	queratina 16 (queratoderma palmoplantar focal não-epidermolítica)	-3,11	-1,02
32	NM_006945	SPRR2B	pequena proteína rica em prolina 2B de <i>Homo sapiens</i>	-6,54	-1,03

Tabela 4D. Metabolismo de lipídeos e cálcio

Gene	Número de acesso	Nome	Descrição	90 mg de R	Placebo
33	NM_000359	TGM1	transglutaminase 1 (polipeptídeo epidérmico K tipo I, proteína-glutamina-gama-glutamilttransferase)	-2,04	-1,01
34	NM_002079	GOT1	transaminase glutâmica-oxaloacética 1, solúvel (aspartato aminotransferase 1)	-1,78	1,01
35	NM_005620	S100A1 1	proteína de ligação de cálcio S100 A11 (calgizarina)	-1,50	-1,09

Tabela 4E. Receptores

Gene	Número de acesso	Nome	Descrição	90 mg de R	Placebo
36	NM_000418	IL4R	receptor de interleucina 4	-1,92	-1,08

Mudanças na expressão de genes detectadas por RT-PCR

5

Sobre as amostras de RNA deixadas após análise de microarranjos, análise Taqman foi realizada em alguns dos genes na Tabela 4. Um micrograma de RNA total no volume de 50 ul foi convertido em cDNA na

presença de Transcriptase Inversa *MultiScribe*. A reação foi realizada incubando por 10 minutos a 25°C seguida de 30 minutos a 48°C. Transcriptase Inversa foi inativada a 95°C por 5 minutos. Vinte nanogramas de cDNA por reação foram usados em PCR em tempo real com o sistema ABI 7900 (*Foster City, Califórnia*). Na presença de DNA polimerase AmpliTaq Gold (*ABI biosystem, Foster City, Califórnia*), a reação foi incubada por 2 minutos a 50°C seguida de 10 minutos a 95°C. Em seguida, a reação processou-se por 40 ciclos a 15 segundos, 95°C e 1 minuto, 60°C por ciclo.

O gene preparatório GAPDH (gliceraldeídos-3-fosfato desidrogenase) foi usado para normalizar expressão genética.

As Figuras 2A-D mostram o padrão de expressão de genes de SERPINB3 (A), SERPINB4 (B), GJB2 (C) e IL1F9 (D) detectado por Taqman que geralmente confirma as mudanças observadas na expressão relativa desses genes específicos calculadas usando a análise de microarranjos.

15 Sumário dos Dados

Em sumário, um painel de biomarcadores moleculares potenciais que são indicativos de resultado favorável do tratamento de psoríase foi identificado ao longo da direção em que eles são modulados. Esse painel de biomarcadores é particularmente útil na orientação de estudo clínico, visto que a mudança na expressão de genes nesse painel aparece antes do aperfeiçoamento de parâmetros clinicamente mensuráveis, tais como escore PASI (Índice de Área e Gravidade de Psoríase), poder ser obtido e/ou detectado. Assim, os 36 genes identificados representam um painel de genes relacionados à psoríase que pode ser usado como ferramenta para monitorar a eficácia de qualquer psoríase terapêutica, tal como CNTO 1275, e proporcionar informação valiosa que oriente regimes de dosagem.

Um painel de genes identificados como genes relacionados à psoríase aqui demonstrou relevância em relação à psoríase, pele e inflamação. Como demonstrado pela presente análise, o painel como um todo proporciona uma impressão digital para avaliar a eficácia de um tratamento de psoríase que conduz a uma melhora na complicação e gravidade de lesões na pele. Vários genes, que são membros do painel de genes relacionados à

psoríase, foram mostrados anteriormente ser aberrantemente expressos em pele psoriática. Por exemplo, níveis elevados de IL1F5, IL1F9 e IL1RN têm sido relatados ser substancialmente induzidos em pele com psoríase. O presente estudo proporciona evidência de que IL1F5, IL1F9 e IL1RN são citocinas-chave que mantêm o *status* inflamatório nesse distúrbio. Outros genes, tais como IL-8 e PI3, são comuns a outras doenças inflamatórias. Desse modo, juntamente, genes de monitoramento nesse painel proporcionam um método para avaliar fármacos candidatos e, nesse caso, a modulação da expressão desses genes prediz o resultado clínico de uma terapia de psoríase.

Embora ilustrada e descrita acima com referência a certas modalidades específicas, a presente invenção não pretende, todavia, limitar-se aos pormenores mostrados. Preferencialmente, a presente invenção refere-se aos genes relacionados à psoríase e a produtos genéticos. Polinucleotídeos, anticorpos, aparelho e *kits* descritos aqui e seus usos, e métodos para controlar os níveis dos genes biomarcadores relacionados à psoríase, e várias modificações poderão ser produzidos nos pormenores no escopo e faixa de equivalentes das reivindicações e sem se afastar do espírito da invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para avaliação prognóstica ou diagnóstica de um distúrbio relacionado à pele em um indivíduo, método este que compreende:

5 a) preparar uma amostra de ácidos nucleicos de um espécime obtido do indivíduo;

b) contatar a amostra com painel de segmentos de ácidos nucleicos que consistem em pelo menos 2 membros do grupo que consiste em genes 1-36 para detectar os níveis dos segmentos do painel;

10 c) avaliar a amostra contra um padrão de referência para determinar a magnitude de alteração nas quantidades de pelo menos 2 membros presentes na amostra; e

d) correlacionar a magnitude de alteração com a presença ou resolução do distúrbio relacionado à pele.

15 2. Método, de acordo com a reivindicação 1, no qual o indivíduo é um paciente que apresenta um distúrbio relacionado à pele e etapas a) a d) são realizadas antes, durante, e/ou após tratamento do paciente com uma terapia para o distúrbio relacionado à pele.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, no qual o distúrbio relacionado à pele é psoríase.

20 4. Método, de acordo com a reivindicação 2, no qual o padrão de referência é do grupo que consiste de tecido da pele de um paciente normal, tecido da pele de um paciente em psoríase não-tratado, e tecido da pele de um paciente com psoríase tratado.

25 5. Método, de acordo com a reivindicação 2, no qual o padrão de referência é do indivíduo antes de tratamento com uma terapia, a amostra de ácidos nucleicos é do indivíduo após tratamento com uma terapia, e a etapa de correlação avalia a eficácia de tratamento com a terapia.

6. Método, de acordo com a reivindicação 2, no qual a terapia é um anticorpo anti-IL-12.

30 7. Método, de acordo com a reivindicação 6, no qual o anticorpo anti-IL-12 é CNTO1275.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, no qual a coleção é

um ensaio de segmentos de ácidos nucleicos.

9. Método, de acordo com a reivindicação 2, no qual a amostra é de uma lesão na pele de um paciente selecionado do grupo que consiste de pacientes suspeitos de apresentar psoríase em placas, pacientes diagnosti-
5 cados com psoríase que são submetidos a tratamento com um agente aprovado, e pacientes diagnosticados com psoríase que são submetidos a tratamento com um agente experimental.

10. Método, de acordo com a reivindicação 2, no qual a amostra é de uma fonte selecionada do grupo que consiste de um paciente propor-
10 cionando a amostra antes de administração de uma terapia, um paciente tratado com placebo que apresenta um distúrbio relacionado à pele, e uma amostra de um biobanco.

11. Método, de acordo com a reivindicação 1, no qual pelo me-
nos um gene da coleção é um selecionado do grupo que consiste de citoci-
15 nas, quimiocinas, fatores de transcrição, proteases, inibidores de protease, moléculas estruturais e de adesão, receptores, e genes para proteínas envolvidas no metabolismo lipídico.

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, no qual a amostra compreende uma amostra de biópsia da pele.

20 13. Método, de acordo com a reivindicação 1, no qual a amostra compreende células sanguíneas periféricas.

14. Método, de acordo com a reivindicação 1, no qual a amostra é contatada com um painel de segmentos de ácidos nucleicos que compre-
endem pelo menos 4 membros do grupo que consiste de genes 1-36.

25 15. Método, de acordo com a reivindicação 14, no qual pelo me-
nos quatro segmentos de ácido nucleico são representativos de, ou selecio-
nados do grupo que consiste em IL1F5 (Gene 1), IL1F9 (Gene 2), e PBEF
(Gene 27); o grupo consistindo em SERPIN B3 (Gene 11), SERPIN B4 (Ge-
ne 10), e SERPIN B13 (Gene 13); o grupo consistindo de KLK10 (Gene 29)
30 e KLK13 (Gene 8); e o grupo consistindo de CCL3 (Gene 6), BLMH (Gene
7), e GJB2 (Gene 16).

16. Método, de acordo com a reivindicação 1, no qual pelo me-

nos um de dois segmentos de ácido nucleico é representativo de, ou selecionado do grupo que consiste de CXCL1 (Gene 5), CCL3 (Gene 6), BLMH (Gene 7), GJB2 (Gene 16), IL1F5 (Gene 1), IL1F9 (Gene 2), SERPIN B3 (Gene 11), SERPIN B4 (Gene 10), SERPIN B13 (Gene 13), KLK10 (Gene 29),
 5 PBEF (Gene 27), S100A11 (Gene 35), IL4R (Gene 36), e KLKL13 (Gene 8).

17. Método, de acordo com a reivindicação 1, no qual pelo menos dois segmentos genéticos são representativos de, ou selecionados do grupo que consiste de IL1F5 (Gene 1), IL1F9 (Gene 2), e PBEF (Gene 27); e do grupo que consiste de CCL3 (Gene 6), BLMH (Gene 7) e GJB2 (Gene 16).

10 18. Método para avaliação prognóstica ou diagnóstica de um distúrbio relacionado à pele em um indivíduo, que compreende:

a) preparar uma amostra de ácidos nucleicos de uma amostra obtida de um paciente;

b) contatar a amostra com um painel de segmentos de ácido nucleico que consiste de pelo menos um membro do grupo que consiste de
 15 IL1F5 (Gene 1), IL1F9 (Gene 2), CCL3 (Gene 6), BLMH (Gene 7), GJB2 (Gene 16), PBEF (Gene 27), S100A11 (Gene 35), e IL4R (Gene 36) para detectar a presença dos segmentos do painel;

c) avaliar a amostra contra um padrão de referência para determinar a alteração e/ou magnitude de alteração no nível de expressão das
 20 quantidades de pelo menos um membro presente na amostra; e

d) correlacionar a alteração e/ou magnitude de nível de expressão com a presença ou resolução do distúrbio relacionado à pele.

19. Método de teste com base em arranjo para avaliação prognóstica ou diagnóstica de um distúrbio relacionado à pele em um paciente, método este que compreende:

a) preparar uma mistura de ácidos nucleicos de um espécime obtido de um paciente;

b) marcar esse espécime de ácidos nucleicos com um marcador
 30 detectável para formar uma amostra;

c) contatar a amostra com um arranjo que compreende uma pluralidade de segmentos de ácidos nucleicos, na qual cada segmento de ácido

nucléico é imobilizado a uma expressão distinta e conhecida em uma superfície do substrato do ensaio, em que pelo menos dois membros de um painel genético relacionado à pele que consiste de Genes 1-36 são identificados como aspectos do ensaio por meio de expressão, e em que o ensaio adicionalmente compreende pelo menos um ácido nucleico de calibração sob uma expressão conhecida no substrato;

d) determinar o grau de ligação dos ácidos nucleicos do espécime com os segmentos de ácidos nucleicos; e

e) comparar o grau de ligação a um padrão de referência para facilitar uma avaliação prognóstica ou diagnóstica.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, o qual adicionalmente compreende a etapa de realizar uma comparação estatística dos ácidos nucleicos de espécime de pacientes com distúrbio relacionado à pele tratados com uma terapia com um padrão de referência para avaliar o efeito de tratamento com a terapia.

21. Método, de acordo com a reivindicação 20, no qual o distúrbio relacionado à pele é psoríase e o painel genético relacionado à pele é um painel genético relacionado à psoríase.

22. Método, de acordo com a reivindicação 21, no qual a terapia é um anticorpo anti-IL-12.

23. Método, de acordo com a reivindicação 22, no qual o anticorpo anti-IL-12 é CNTO1275.

24. Método, de acordo com a reivindicação 20, no qual o espécime é de uma lesão na pele de um paciente selecionado do grupo de pacientes suspeitos de apresentar psoríase em placas, pacientes diagnosticados com psoríase não sendo submetidos a tratamento, e pacientes diagnosticados com psoríase sendo submetidos a tratamento com uma terapia.

25. Método, de acordo com a reivindicação 20, no qual o espécime é de uma fonte selecionada do grupo que consiste de um paciente proporcionando o espécime antes de administração de uma terapia, um paciente apresentando uma doença ou condição similar tratada com um placebo, e uma amostra de um biobanco.

26. Método, de acordo com a reivindicação 20, no qual os membros do painel genético são selecionados do grupo que consiste de citocinas, quimiocinas, fatores de transcrição, proteases, inibidores de protease, moléculas estruturais e de adesão, receptores, e genes de proteínas envolvidas no metabolismo lipídico.

27. Método, de acordo com a reivindicação 20, no qual o espécime compreende uma amostra de biópsia da pele.

28. Método, de acordo com a reivindicação 20, no qual o espécime compreende células sanguíneas periféricas.

29. Método, de acordo com a reivindicação 21, no qual a comparação do grau de etapa de ligação adicionalmente compreende um teste rigoroso da similaridade de alterações de intensidade de aspecto do ensaio do painel genético relacionado à psoríase.

30. Reagente para testar a sensibilidade de uma célula ou indivíduo a um distúrbio relacionado à pele, o qual compreende pelo menos dois membros selecionados do grupo que consiste de um oligonucleotídeo que compreende pelo menos 15 nucleotídeos complementares a uma sequência de nucleotídeos de um dos Genes 1-36, um polipeptídeo codificado por pelo menos uma parte de um dos Genes 1-36, e um ligante para o polipeptídeo codificado por pelo menos uma parte de um dos Genes 1-36.

31. Reagente, de acordo com a reivindicação 30, no qual o distúrbio relacionado à pele é psoríase.

32. Método de teste para sensibilidade a um distúrbio relacionado à pele em uma amostra de paciente que compreende contatar a amostra com o reagente, como definido na reivindicação 30.

33. Método, de acordo com a reivindicação 32, no qual o teste é feito por RT-PCR.

34. Método, de acordo com a reivindicação 32, no qual o teste é feito por ELISA.

35. Método de teste da eficácia de uma terapia para um distúrbio relacionado à pele, método este que compreende:

a) contatar uma amostra de um paciente que é tratado de dis-

túrbio relacionado à pele com o reagente, como definido na reivindicação 30;

b) medir níveis de pelo menos dois membros;

c) comparar os níveis com um padrão de referência, e

d) correlacionar os níveis de pelo menos dois membros com a
5 eficácia da terapia.

36. Método, de acordo com a reivindicação 35, no qual o distúrbio relacionado à pele é psoríase.

37. Método, de acordo com a reivindicação 35, no qual a terapia compreende um antagonista de IL-12, IL-23, ou ambos.

10 38. Método, de acordo com a reivindicação 37, no qual o antagonista é um anticorpo para IL-12 e IL-23.

39. Método, de acordo com a reivindicação 38, no qual o anticorpo para IL-12 e IL-23 é CNTO1275.

15 40. Método, de acordo com a reivindicação 35, no qual o padrão de referência é do grupo que consiste de tecido da pele de um paciente normal, tecido da pele de um paciente com psoríase não tratado, e tecido da pele de um paciente com psoríase tratado.

20 41. Método, de acordo com a reivindicação 35, no qual pelo menos dois membros são selecionados do grupo que consiste de citocinas, quimiocinas, fatores de transcrição, proteases, inibidores de protease, moléculas estruturais e de adesão, receptores, e genes de proteínas envolvidas no metabolismo lipídico.

42. Método, de acordo com a reivindicação 35, no qual a amostra compreende uma amostra de biópsia da pele.

25 43. Método, de acordo com a reivindicação 35, no qual a amostra compreende células sanguíneas periféricas.

44. Método, de acordo com a reivindicação 35, no qual a amostra é contatada com um painel de segmentos de ácido nucléico que compreendem pelo menos 4 membros do grupo que consiste de Genes 1-36.

30 45. Método, de acordo com a reivindicação 44, no qual pelo menos quatro segmentos de ácidos nucleicos são representativos de, ou selecionados do grupo que consiste de IL1F5 (Gene 1), IL1F9 (Gene 2), e PBEF

(Gene 27); o grupo consistindo em SERPIN B3 (Gene 11), SERPIN B4 (Gene 10), e SERPIN B13 (Gene 13); o grupo consistindo em KLK10 (Gene 29) e KLK13 (Gene 8); e o grupo que consiste de CCL3 (Gene 6), BLMH (Gene 7), e GJB2 (Gene 16).

5 46. Método, de acordo com a reivindicação 35, no qual pelo menos um de dois membros é representativo de, ou selecionado do grupo que consiste de CXCL1 (Gene 5), CCL3 (Gene 6), BLMH (Gene 7), GJB2 (Gene 16), IL1F5 (Gene 1), IL1F9 (Gene 2), SERPIN B3 (Gene 11), SERPIN B4 (Gene 10), SERPIN B13 (Gene 13), KLK10 (Gene 29), PBEF (Gene 27),
10 S100A11 (Gene 35), IL4R (Gene 36), e KLK13 (Gene 8).

47. Método, de acordo com a reivindicação 35, no qual pelo menos dois membros são representativos de, ou selecionados do grupo que consiste de IL1F5 (Gene 1), IL1F9 (Gene 2), e PBEF (Gene 27); e do grupo que consiste de CCL3 (Gene 6), BLMH (Gene 7) e GJB2 (Gene 16).

15 48. Agente terapêutico para psoríase, o qual compreende uma sequência de polinucleotídeo complementar a uma sequência que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contínuos de pelo menos um dos genes selecionados do grupo que consiste de Genes 1-36.

20 49. Agente terapêutico, de acordo com a reivindicação 48, no qual a sequência de polinucleotídeo é DNA antissenso.

50. *Kit* para uso prognóstico ou diagnóstico, o qual compreende um oligonucleotídeo compreendendo pelo menos 15 nucleotídeos complementares a um polinucleotídeo que compreende a sequência de nucleotídeo de um gene marcador ou a fita complementar deste, e células que expressam o
25 gene marcador, no qual o gene marcador é selecionado do grupo que consiste de Genes 1-36.

51. *Kit* para seleção de um agente terapêutico para psoríase, *kit* este que compreende um anticorpo que reconhece um peptídeo que compreende uma sequência de aminoácido codificada por um gene marcador e células que expressam o gene marcador, no qual o gene marcador é
30 selecionado do grupo que consiste de Genes 1-36.

52. Qualquer invenção descrita neste relatório.

[Handwritten mark]

FIG 1

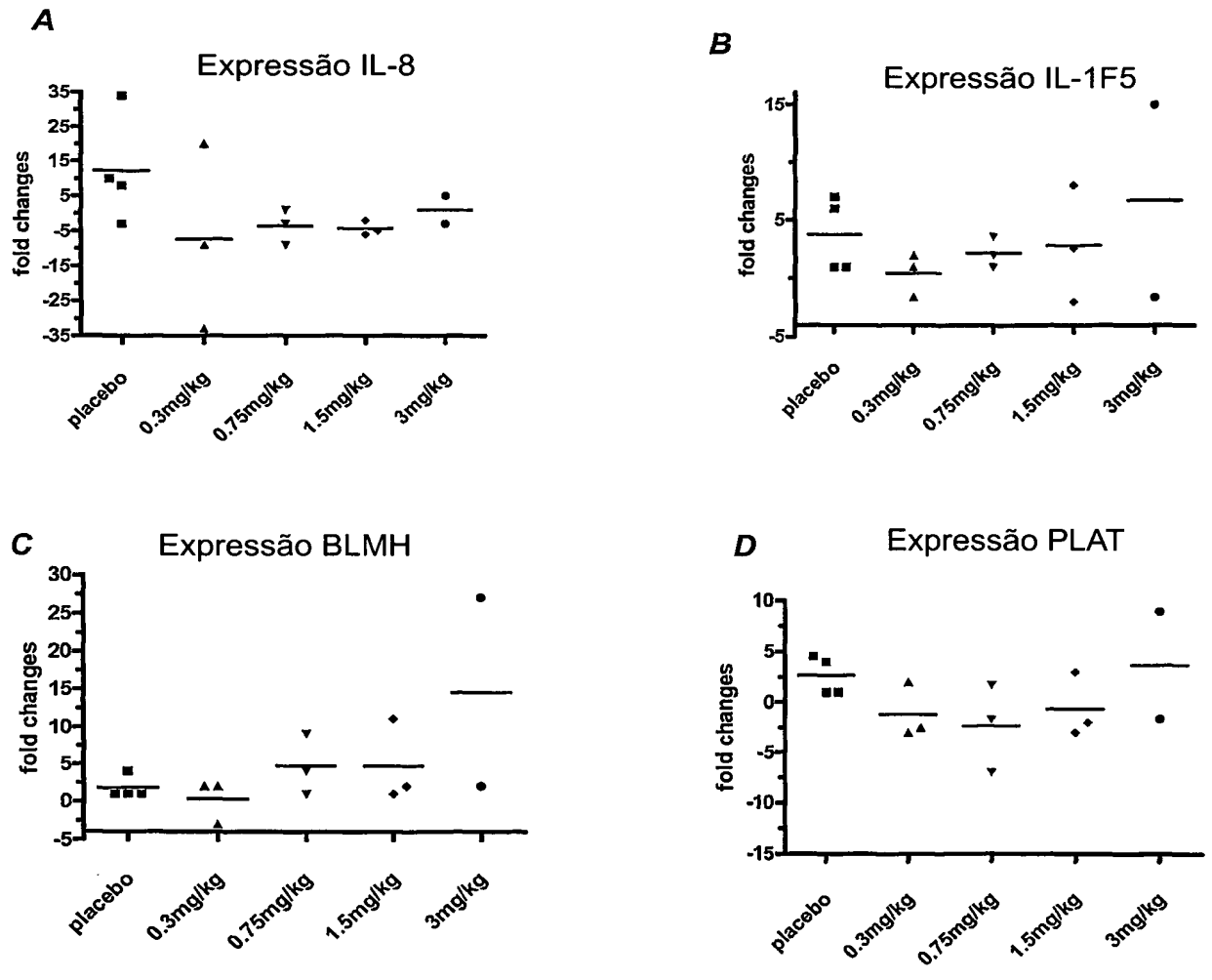


FIG 2

Expressão dos 13 genes relacionados através das análises do TaqMan®. Cada ponto representa uma mostra individual. O valor médio de cada grupo também é indivíduo. O nível de impressão do gene foi expresso como uma razão do gene do teste para controlar o gene GAPDH, usando o método ΔC_t . Testes-T foram conduzidos entre o respondedor tratado na semana 12 e a referência, que é definida por todas as amostras do dia 0. Apenas aqueles que tiveram o $P < 0,05$ foram marcados

2A.

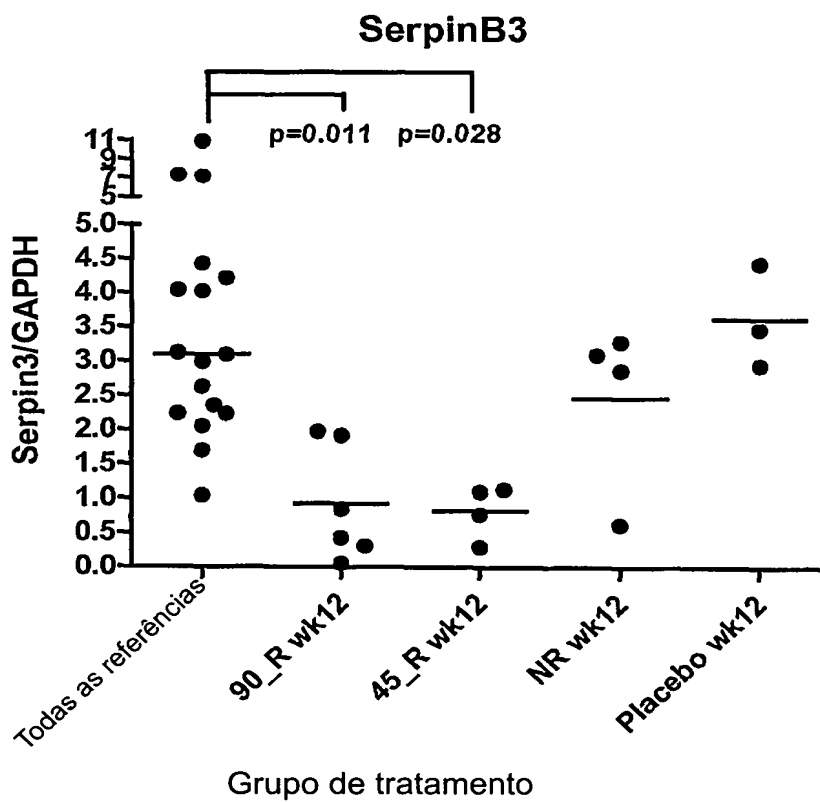
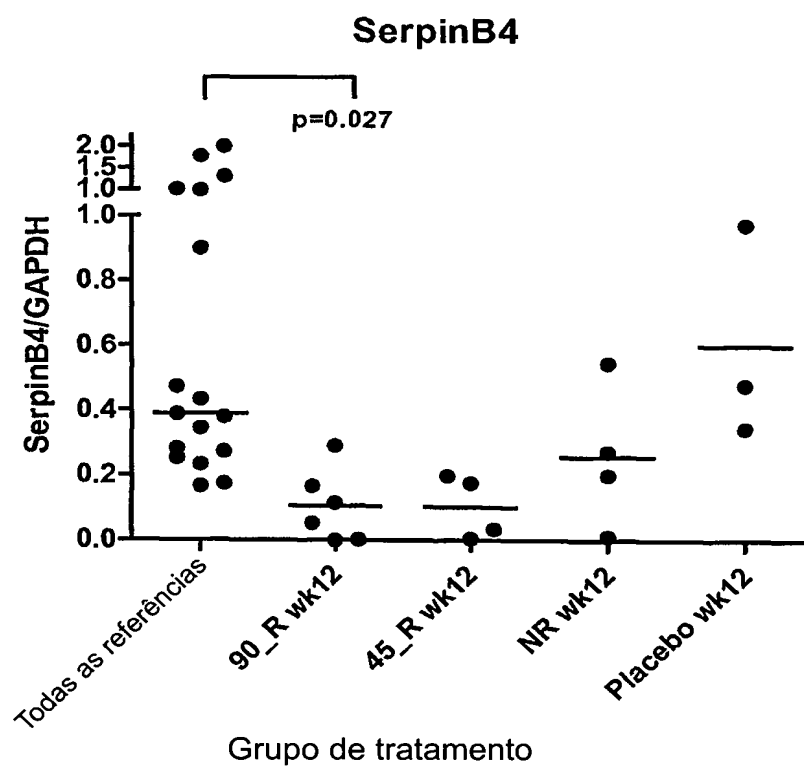


FIG 2
(Continuação)

2B.



2C.

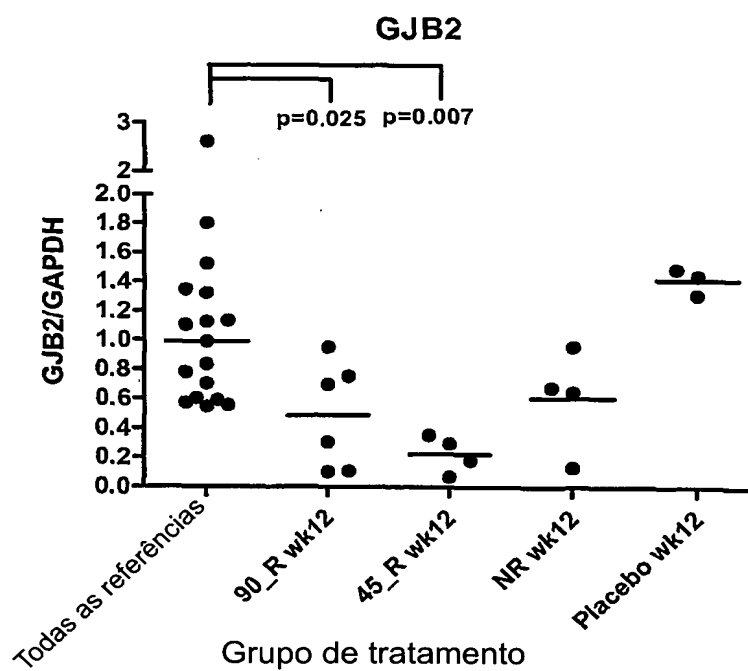
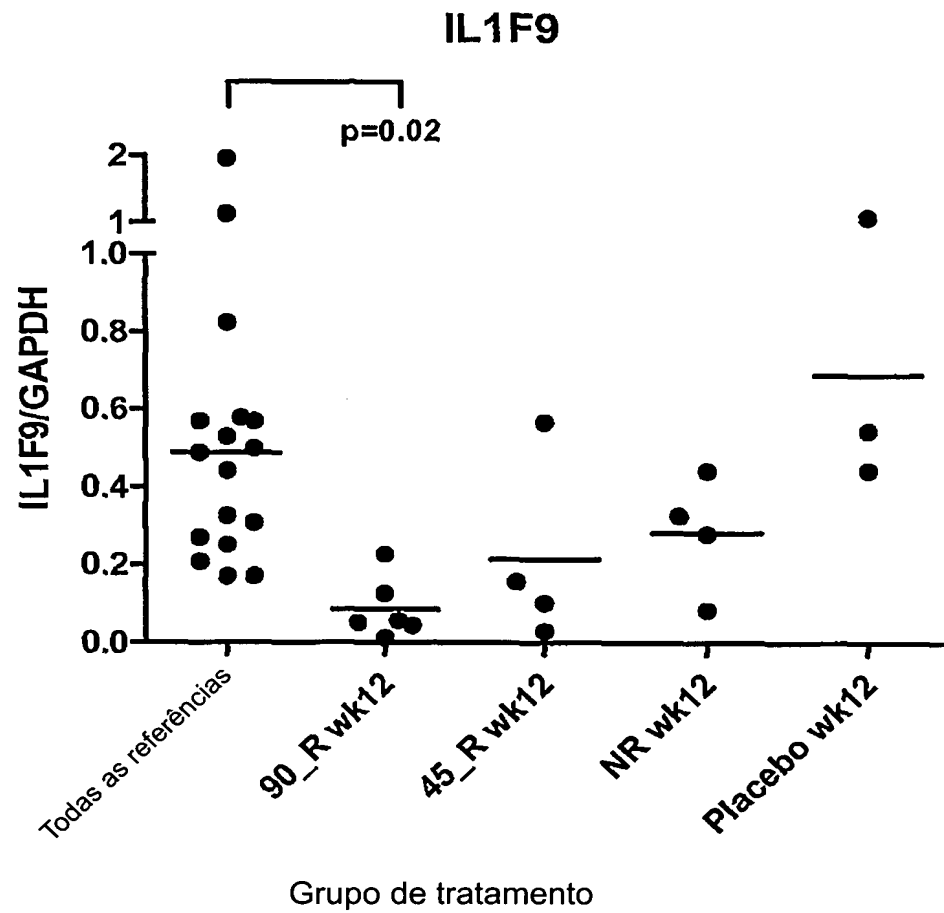


FIG 2
(Continuação)

2D.



RESUMO

Patente de Invenção: "MARCADORES E MÉTODOS PARA AVALIAR E TRATAR PSORÍASE E DISTÚRBIOS RELACIONADOS".

- 5 A presente invenção refere-se a um método para avaliação prognóstica ou diagnóstica de um distúrbio relacionado à pele, tal como psoríase, em um indivíduo, que correlaciona a presença, ausência, e/ou magnitude de um gene em uma amostra com um padrão de referência para determinar a presença e/ou gravidade do distúrbio, e/ou a resposta a tratamento do distúrbio. O método facilita identificação da eficácia de terapias candidatas.