



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

(21) **PI 0613942-6 A2**

(22) Data de Depósito: 10/07/2006
(43) Data da Publicação: 21/11/2012
(RPI 2185)



(51) *Int.Cl.:*
A01K 29/00
A01K 1/03
A01K 67/02

(54) Título: MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE UMA POPULAÇÃO DE ANIMAIS MAMÍFEROS TENDO UM METABOLOMA ESSENCIALMENTE IDÊNTICO, PARA A IDENTIFICAÇÃO DE UM COMPOSTO QUE EFETUA O METABOLOMA DE UM ANIMAL, E PARA A IDENTIFICAÇÃO DE UM MARCADOR PARA UM COMPOSTO QUE EFETUA O METABOLOMA DE UM MAMÍFERO

(30) Prioridade Unionista: 25/07/2005 EP 05016064.7,
26/08/2005 EP 05018611.3

(73) Titular(es): BASF AKTIENGESELLSCHAFT

(72) Inventor(es): BENNARD VAN RAVENSWAAY, GEORGIA
COELHO PALERMO CUNHA, JAN C. WIEMER, RALF LOOSER,
TILMANN B. WALK, VOLKER HAAKE, WERNER MELLERT

(74) Procurador(es): MOMSEN, LEONARDOS & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006064053 de
10/07/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/014825de
08/02/2007

(57) Resumo: MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE UMA POPULAÇÃO DE ANIMAIS MAMÍFEROS TENDO UM METABOLOMA ESSENCIALMENTE IDÊNTICO, PARA A IDENTIFICAÇÃO DE UM COMPOSTO QUE EFETUA O METABOLOMA DE UM ANIMAL, E PARA A IDENTIFICAÇÃO DE UM MARCADOR PARA UM COMPOSTO QUE EFETUA O METABOLOMA DE UM MAMÍFERO. A presente invenção refere-se a um método para a produção de uma população de animais tendo um metaboloma essencialmente idêntico, composto de uma população de animais que são essencialmente da mesma idade, mantendo a referida população de animais durante um período de tempo suficiente para a climatização nas seguintes condições de armazenamento: (i) temperatura constante, (ii) umidade constante, (iii) separação física dos animais da população de animais, (iv) alimentação da libitum, onde a comida a ser alimentada é essencialmente isenta de contaminação química ou microbiana, (v) bebida da libitum, onde o líquido de bebida é essencialmente isento de produtos químicos ou contaminação microbiana, (vi) período constante de iluminação, e disponibilidade da população de animais após o referido período de tempo. Além disso, a presente invenção refere-se a métodos para a identificação de um composto que efetua o metaboloma de um animal, ou a métodos para a identificação de um marcador de tais compostos. Além disso, a presente invenção inclui métodos para a identificação de tais compostos ou marcadores dos mesmos, compreendendo a análise metabólica de uma amostra de pelo menos um animal de uma população de animais.

“MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE UMA POPULAÇÃO DE ANIMAIS MAMÍFEROS TENDO UM METABOLOMA ESSENCIALMENTE IDÊNTICO, PARA A IDENTIFICAÇÃO DE UM COMPOSTO QUE EFETUA O METABOLOMA DE UM ANIMAL, E PARA A IDENTIFICAÇÃO DE UM MARCADOR PARA UM COMPOSTO QUE EFETUA O METABOLOMA DE UM MAMÍFERO”

Descrição

A presente invenção refere-se a um método para a produção de uma população de animais tendo um metaboloma essencialmente idêntico, composto da compilação de uma população de animais sendo essencialmente da mesma idade, mantendo a referida população de animais durante um período de tempo suficiente para a aclimatização nas seguintes condições de armazenamento: (i) temperatura constante, (ii) umidade constante, (iii) separação física dos animais da população de animais, (iv) alimentação ad libitum, onde o alimento a ser alimentado é essencialmente isento de contaminantes químicos ou microbianos, (v) líquido de bebida ad libitum, onde o líquido de bebida é essencialmente isento de contaminantes químicos ou microbianos, (vi) período constante de iluminação, e disponibilidade da população de animais após o referido período de tempo. Além disso, a presente invenção refere-se a métodos para a identificação de um composto que efetua o metaboloma de um animal, ou a métodos para a identificação de um marcador para tais compostos. Além disso, a presente invenção inclui métodos para a identificação de tais compostos ou marcadores dos mesmos, compreendendo a análise metabólica de uma amostra de pelo menos um animal de uma população de animais.

As técnicas do estado da arte da análise do fenótipo de organismos são compostas, inter alia, da análise do genoma inteiro do referido organismo, chamado genômicos, a análise da integridade das proteínas, chamadas de proteômicos, e a análise da integridade dos transcritos de RNA.

Mais recentemente, estas técnicas fundamentais de análise de fenótipos tem sido completada pela análise do metaboloma, a integridade dos metabólitos de um organismo. Esta análise é chamada metabolômica ou, algumas vezes, metabonômica. As metabolômicas podem ser definidas como a determinação qualitativa e quantitativa de todos os compostos de baixo peso molecular (i.e. metabólitos) em uma célula de organismo ou fluido do corpo em um tempo específico e sob condições ambientais específicas. Uma vantagem dos metabolômicos é que os efeitos causados pelos fatores exógenos podem ser monitorados imediatamente devido às alterações metabólicas e usualmente aparecem muito mais cedo do que as alterações, se alguma, no proteoma ou mesmo no genoma.

Já têm sido descritas várias técnicas para a análise do metaboloma de um organismo. Estas técnicas incluem, por exemplo, espectroscopia de massa, NMR, espectroscopia de infravermelho de transformada de Fourier (FT-IR), e detecção de ionização de chama (FID), opcionalmente acoplado a técnicas de separação cromatográfica, tais como a cromatografia líquida, cromatografia gasosa ou HPLC. Estas técnicas permitem uma seleção de produção elevada de grandes populações de organismos para variações na composição do seu metaboloma, i.e., eles permitem a determinação de um fenótipo metabólico. Um fenótipo metabólico de organismo é a integridade dos seus metabólitos (metaboloma) em um tempo determinado e é o resultado de interações complexas entre a sua composição genética e o meio de vida do organismo. Assim sendo, as diferenças no metaboloma dos indivíduos de uma população de organismos poderá ser causada não somente pelas diferenças no genoma, mas também por fatores ambientais que influenciam as atividades metabólicas. Os metabolômicos, assim sendo, permitem determinar até mesmo os efeitos de fatores exógenos que não influenciam o genoma, a transcrição ou proteoma de um organismo imediatamente. Por exemplo, um composto tóxico é prejudicial

a um organismo mas não necessariamente deve provocar alterações no genoma do referido organismo.

Atualmente, uma desvantagem nos metabolômicos em comparação com outras aprovações da análise fenotípica principal é que os organismos e, especialmente, os animais que são utilizados nos estudos metabólicos na arte anterior não compartilham um metaboloma comum no início de um estudo. Nos genômicos, por exemplo, uma população tendo um genoma essencialmente idêntico, pode ser facilmente produzida através de técnicas de clonagem do estado da arte. Todavia, seria altamente desejável detectar-se influências metabólicas de fatores exógenos, tais como compostos ou drogas tóxicos, sob condições otimizadas. As técnicas para o estabelecimento de animais tendo um metaboloma essencialmente idêntico são a base para uma análise confiável e eficiente do metaboloma. Não obstante portanto a necessidade, tais técnicas ainda não são descritas.

Assim sendo, o problema técnico relativo à presente invenção deve ser visto como a necessidade de métodos para o atendimento das necessidades mencionadas anteriormente, i.e., a produção de uma população de animais que tenham um metaboloma essencialmente idêntico, adequado para estudos de metaboloma confiáveis e análises confiáveis. O problema técnico é resolvido pelas realizações caracterizadas nas reivindicações e que são descritas aqui abaixo.

Assim sendo, a presente invenção refere-se a um método para a produção de uma população de animais, tendo um metaboloma essencialmente idêntico, composto de:

a) compilar uma população de animais que são essencialmente da mesma idade;

b) manter a referida população de animais da etapa a) durante um primeiro período de tempo suficiente para a aclimatização nas seguintes condições de armazenamento:

- i) temperatura constante;
- ii) umidade constante;
- iii) separação física dos animais da população de animais;
- iv) alimentação ad libitum, onde o alimento a ser alimentado é

5 essencialmente isento de contaminantes químicos ou microbianos.

v) bebida ad libitum, onde o líquido de bebida é essencialmente isento de contaminantes químicos ou microbianos;

vi) período constante de iluminação; e

c) Disponibilização da população de animais da etapa b)
10 depois do referido primeiro período de tempo.

O termo "Método de fornecimento" conforme utilizado aqui, de preferência, não inclui métodos de tratamento do corpo do animal. Especificamente, o método referido aqui não é adequado para o tratamento médico ou terapia de qualquer doença ou distúrbio nem é adequado para
15 melhorar ou manter o bem-estar geral dos animais da população de animais, em comparação com os animais mantidos sob condições fisiológicas. Além disso, o termo não inclui nenhuma técnica de criação por si próprio.

O termo "população de animais" refere-se a uma quantidade de animais. Uma quantidade de animais, conforme usado aqui, é um grupo de é
20 animais consistindo pelo menos de 2, de preferência, 5 a 120, mais de preferência, 5 a 25 dos referidos animais por sexo, dose e momento. Os animais da população de animais são da mesma espécie e, de preferência, da mesma família. Os animais preferidos a serem utilizados no método da presente invenção são mamíferos, mais de preferência, roedores, mais de
25 preferência, ratos ou camundongos. Se são utilizados ratos para o método da presente invenção, é adicionalmente preferido que estes ratos sejam ratos wistar (CrIGIxBrIHan:Wi) (Charles River, USA). Outras famílias preferidas de ratos são: as famílias BDIX; BDIX/CrCri, BDIX/OriCri, as famílias Brown Norway; BN/CriCrij, BN/Cri, BN/OriCri, BN/OriCri, BN/SsNHsdMcwiCri, a

família Buffalo; BUF/CrCri; as famílias Fischer, F344/DuCrt, F344/DuCriCrij, F344/IcoCri, F344/DuCri, a família SASCO Fischer, F344/NCri; as famílias de Copenhague, COP/CrCri, COP/NCri; a família do algodão, COT/NCri; a família Dahl/SS, SS/JrHsdMcwiCri; a família Fawn Hooded, FHH/EurMcwCri; a família GK, GK/Crij; as famílias Lewis, LEW/CriCri; LEW/CrI; a família Noble, NBL/CriCri; as famílias SHR, SHR/NCriCrij, SHR/NCri, SHR/NCri; a família WAG, WAG/RijCri; a família Wistar Furth, WF/CrCri, WF/IcoCri; as famílias WKY, WKY/NCri, WKY/NCriCrij, WKY/NIcooCri; as famílias ZDF, ZDF/CrI-Lepr^{fa}, ZSDF/CrI-Lepr^{fa}; as famílias CD, Cri:CD(SD), Crij:CD(SD), Cri:CD(SD), Cri:CD(SD); a família SASCO SD, Cri:SD; as famílias OFA, Cri:OFA(SD), Cri:OFA(SD)-hr; a família DIO, Cri:CD(SD)DR; a família DR, Cri:CD(SD)DR; a família Donryu, Crij:DON; a família LEC, Crij:LEC; as famílias Wistar, Crij:WI, Cri:WI; as famílias Wistar Han, Cri:WI(Han), Cri:WI(Han), Cri:WI (Han), Cri:WI(Han); a família Wistar WU, Cri:WI(WU) ou qualquer família que é derivada das famílias mencionadas anteriormente através de uma criação cruzada ou manipulação genética. As famílias mencionadas anteriormente são bem conhecidas na arte e são disponíveis comercialmente, por exemplo, através da Charles River, USA ou Harlan, USA. Se são utilizados camundongos para o método da presente invenção, é preferível que os camundongos sejam camundongos C57BL/GNCri (Charles River, USA). Outras famílias preferidas de camundongos são: as famílias CD-1, Crij:CD1(ICR), Cri:CD1(ICR), Cri:CD1(ICR), Cri:CD1(ICR), Cri:CD1(ICR), as famílias CF-1, Cri:CF1, Cri:OF1; e as famílias CFW, Cri:CFW(SW); as famílias NMRI, Cri:NMRI, Cri:NMRI (Han); a família PGP, Cri:CF1-Abcb 1a; as famílias SKH1, Cri:SKH1-hr, Cri:SKH1-hr; a família SKH2, Cri:SKH2-hr; a família A/J, A/J; as famílias 129, 129S2/SvPasCri, 129S2/SvPasCri, 129/S1/Sv-p⁺Tyr⁺Kit^{SI-J}/Cri, 129/s1/svimJ; família AKR, AKR/NCri; famílias BALB/c, BALB/cAnNCriCrij,

BALB/CAnNCri, BALB/cByJ; famílias C3H, C3H/HeJCri, C3H/HeNCriCrij, C3H/HeNcri, C3H/HeOuJ; famílias C57BL/6, C57BL/6JCri, C57BL/6J, C57BL/6JCri, C57BL/6NCriCrij, C57BL/6NCri, C57BL/6J, C57BL/6JCri, C57BL/6J; famílias C57BL/10, C57BL/10JCri, C57BL/10JCri; famílias

5 CBA, CBA/CaCrij, CBA/J, CBA/JNCrij, CBA/JNCrijCrij; família CB17, CB17/IcrCrij; família DBA/1, DBA/1JCRL, DBA/1JNCrij, DBA/1NIcoCrij; famílias DBA/2, DBA/2J, DBA/2NCriCrij, DBA/2NCri, DBA/2JCri; família FVB, FVB/NCri; família NC, NC/NgaTndCrij; família NOD, NOD/LtJCri; famílias SJL, SJL/JOriCrij, SJL/JOri/Cri/CriCrij, SJL/J, SLJ/JCrij; famílias

10 B6C3F1, B6C3F1/Cri, B6C3F1/Crij; famílias B6CBAF1, B6CBAF1/Cri, B6CBAF1/J, B6CBAF1/Crij; famílias BDF1 (B6D2F1), B6D2F1/Cri, B6D2F1/J, B6D2F1/Crij; família B6SJLF1, B6SJLF1/J; família C3D2F1, C3D2F1/Cri; famílias CDF1 (CD2F1), CD2F1/Cri, CD2F1/Crij, CD2F1/Cri; família CBAB6F1, CBAB6F1/Cri; família CB6F1, CB6F1/Cri; família

15 NMRCF1, NMRCF1/Cri ou qualquer família que é derivada das famílias mencionadas anteriormente, por intermédio de criação cruzada ou manipulação genética. As famílias mencionadas anteriormente são bem conhecidas na arte e são disponíveis comercialmente, como por exemplo, através da Charles River, USA ou Harlan, USA. Outros animais preferidos

20 são cachorros. Os cachorros preferidos incluem beagles, mais de preferência, as famílias de beagle HsdRdg:DOBE ou HsdHFr:DOBE ou famílias que são derivadas das famílias mencionadas anteriormente através da criação cruzada ou manipulação genética. As famílias mencionadas anteriormente podem ser compradas da Harlan, USA. Outros beagles preferidos são de uma família que

25 não é de criação e podem ser comprados da BASF AG, Alemanha. Todavia, os animais a serem usados não são limitados aos animais mencionados anteriormente e poderão ainda ser escolhidos do grupo consistindo de gatos, cavalos, vacas, ovelhas, gansos, coelhos, peixes, pássaros, e insetos, tais como moscas de frutas (drosófila).

O termo "metaboloma", conforme utilizado aqui, refere-se a integridade dos metabólitos em uma célula, tecido, órgão ou o animal inteiro. Os metabólitos são, de preferência, compostos por moléculas pequenas, tais como substratos para enzimas de rotas metabólicas, intermediários de tais rotas de produtos obtidos através de uma rota metabólica. As rotas metabólicas são bem conhecidas na arte e poderão variar entre as espécies. De preferência, a referida rota inclui pelo menos um ciclo de ácido cítrico, cadeia respiratória, fotossíntese, foto-expiração, glicólise, gluconeogênese, rota de monofosfato de hexose, rota de fosfato de pentose oxidativo, produção e β -oxidação de ácidos graxos, ciclo de uréia, rotas de biossíntese de aminoácido, rotas de degradação de proteína tais como a degradação proteassomal, rotas de degradação de aminoácidos, biossíntese ou degradação de: lipídios, poliquetídeos (incluindo, por exemplo, flavonóides e isoflavonóides), isoprenóides (incluindo, por exemplo, terpenos, esteróis, esteróides, carotenóides, xantofilis), carboidratos, fenilpropanóides e derivados, alcaloides, benzenoides, indóis, compostos indol-enxofre, porfirinas, antocianos, hormônios, vitaminas, co-fatores, tais como grupos prostéticos ou veículos de elétrons, lignina, glucosinolatos, purinas, pirimidinas, nucleosídeos, nucleotídeos e moléculas relacionadas, tais como tRNAs, microRNAs (miRNA) ou mRNAs. Assim sendo, os metabólitos compostos de moléculas pequenas, de preferência, são compostos das seguintes classes de compostos: álcoois, alcanos, alquenos, alquinos, compostos aromáticos, cetonas, aldeídos, ácidos carboxílicos, ésteres, aminas, iminas, amidas, cianetos, aminoácidos, peptídeos, tióis, tioésteres, fosfato ésteres, sulfato ésteres, tioéteres, sulfóxidos, éteres, ou combinações ou derivados dos compostos mencionados anteriormente. As moléculas pequenas entre os metabólitos poderão ser metabólitos primários que são requeridos para todas as funções normais, funções de órgão ou crescimento dos animais, desenvolvimento da saúde. Além disso, os metabólitos de moléculas pequenas

são ainda compostos de metabólitos secundários tendo função ecológica essencial, como por exemplo, metabólitos que permitem que um organismo se adapte ao seu ambiente. Além disso, os metabólitos não são limitados aos referidos metabólitos primários e secundários, e incluem ainda compostos artificiais de moléculas pequenas. Os referidos compostos de moléculas pequenas artificiais são derivados de moléculas pequenas produzidas exogenamente, que são administrados ou tomados por um organismo mas não são metabólitos primários ou secundários conforme definido acima. Por exemplo, os compostos de moléculas pequenas artificiais poderão ser produtos metabólicos obtidos de fármacos, através de rotas metabólicas do animal. Além disso, os metabólitos incluem ainda peptídeos, oligopeptídeos, polipeptídeos, oligonucleotídeos e polinucleotídeos, tais como RNA ou DNA. Mais de preferência, o metabólito tem um peso molecular de 50 Da (Dalton) a 30.000 Da, mais de preferência, menos de 30.000 Da, menos de 20.000 Da, menos de 15.000 Da, menos de 10.000 Da, menos de 8.000 Da, menos de 7.000 Da, menos de 6.000 Da, menos de 5.000 Da, menos de 4.000 Da, menos de 3.000 Da, menos de 2.000 Da, menos de 1.000 Da, menos de 500 Da, menos de 300 Da, menos de 200 Da, menos de 100 Da. De preferência, um metabólito, no entanto, tem um peso molecular pelo menos de 50 Da. Mais de preferência, um metabólito de acordo com a presente invenção tem um peso molecular de 50 Da até 1.500 Da.

O termo “metaboloma essencialmente idêntico” significa que todos os indivíduos da população animal produzida pelo método da presente invenção apresentam atividades metabólicas sincronizadas resultando (i) na presença essencialmente dos mesmos metabólitos no metaboloma de cada indivíduo da população e (ii) em quantidades dos referidos metabólitos que são essencialmente idênticas para cada um dos indivíduos da população animal. De preferência, as atividades metabólicas sincronizadas, conforme usado aqui, significa que todas as rotas metabólicas que efetuam o

metaboloma dos animais são ativas essencialmente nas mesmas células, tecidos ou órgãos essencialmente ao mesmo tempo, os níveis de expressão de genes em todos os animais são essencialmente idênticos e as moléculas pequenas artificiais são disponíveis para todos os animais essencialmente em

5 quantidades idênticas. Deve ser entendido que as quantidades de metabólito poderão variar entre os indivíduos da população do animal dentro de certos limites. Se os mesmos metabólitos estão presentes essencialmente nas mesmas quantidades dos indivíduos da população animal referida, de acordo com a presente invenção, isto pode ser determinado através de várias técnicas

10 de análise quantitativa e/ou qualitativa do composto. Estas técnicas incluem, mas não são limitadas a técnicas cromatográficas para a separação do composto juntamente com técnicas de análise do composto, tais como o espectrometria de massa (MS). Espectroscopia de ressonância de íons de transformada Fourier (FT-IR), ou FID. De acordo com a presente invenção, é

15 preferível uma determinação quantitativa e/ou qualitativa dos metabólitos, utilizando-se cromatografia líquida e gasosa acoplada com espectrometria de massa (LC-MS e GC-MS). Detalhes dos referidos métodos preferidos são descritos abaixo. De preferência, uma população animal tem um metaboloma essencialmente idêntico se o espectro de massa gerado por uma dessas

20 técnicas é essencialmente idêntico para cada indivíduo da população. O referido espectro de massa é essencialmente idêntico se todos os picos maiores que são detectáveis, por exemplo, através de um algoritmo comercial de anotação de pico, como o ChemStation (Agilent Technologies, USA), Analyst (MDS SCIEX, Canadá) ou AMDIS (NIST, USA), aparecem em

25 todos os espectros essencialmente em tempos de retenção cromatográfica idênticos. Conforme discutido acima, pequenas variações são toleráveis se elas não resultam em diferenças estatisticamente significativas. Se uma variação é, de acordo com a presente invenção, ela pode ser determinada através de algoritmos estatísticos adequados bem conhecidos pela pessoa

adestrada na arte, tais como a análise do componente principal (PCA) ou pelos testes do menor quadrado parcial (PLS. De preferência, um metaboloma essencialmente idêntico de animais da população de animais pode ser determinado juntamente com uma análise multi-variada (por exemplo, PCA) ou "hierarchical clustering".

O termo "compilação" conforme usado aqui refere-se a escolha dos animais de qualquer fonte para se estabelecer a população animal a ser submetida ao método da presente invenção. Assim sendo, os animais poderão ser descendentes do mesmo animal feminino ou descendentes de animais femininos diferentes. No caso de ser usado um só descendente de um animal feminino como a fonte, a prole inteira poderá ser utilizada para se compilar a população animal ou poderão ser utilizados animais escolhidos da prole. A compilação, conforme usado aqui, é executada com relação a idade dos animais, i.e., todos os indivíduos da população devem ter essencialmente a mesma idade, conforme descrito abaixo em detalhes. Todavia, outras características poderão ser levadas em consideração. Além disso, também o peso, sexo, aparência geral (por exemplo, somente animal com aparência saudável poderá ser escolhido).

O termo "essencialmente da mesma idade" significa que os animais têm um estado comparável de desenvolvimento, como por exemplo, os animais poderão ser embriões, jovens ou adultos. Uma idade preferida dos animais a serem usados no método da presente invenção é uma idade do estágio de adolescência, de preferência, o estágio inicial de adolescência. Os animais da população de animais, de preferência, têm uma idade com a faixa de $X \pm n$ dias, onde X é a idade visada da população animal e n é escolhido de um número inteiro de 1 a 5 dias, e mais de preferência, n é 1 dia. Em outras palavras, um determinado animal da população deve ser no máximo um dia mais velho ou mais jovem do que a idade média dos animais da população de animais. Mais de preferência, todos animais da população têm a idade X . Tais

animais podem ser fornecidos compilando-se animais que são uma prole de uma ninhada, i.e., machos da ninhada ou que foram retirados de várias ninhadas no mesmo dia. No caso de serem utilizados embriões, deve ser entendido que essencialmente a mesma idade refere-se ao seu estágio de desenvolvimento dos mesmos. Os estágios de desenvolvimento de embriões de várias espécies pode ser determinado através de técnicas bem conhecidas na arte. Eles poderão ser calculados, por exemplo, com base no momento da fertilização. Além disso, os embriões individuais podem ser desenvolvidos em estágios, devido a características morfológicas conhecidas. Além disso, no caso de serem utilizados embriões, deve-se ainda entender que as fêmeas prenhas que carregam os referidos embriões devem ser mantidas nas condições referidas aqui.

Se são utilizados ratos ou camundongos como animais no método da presente invenção, é preferível que os animais tenham a idade $X \pm 1$ dia, onde X é escolhido entre um número inteiro de 10 a 100 dias, mais de preferência, um número inteiro de 20 a 80 dias, e mais de preferência, X é 63, 64 ou 65 dias após o nascimento. Mais de preferência, X é 64 dias após o nascimento. Se são utilizados cachorros como os animais no método da presente invenção, X de preferência, é 6 meses após o nascimento.

O termo "manter" conforme utilizado de acordo com o método da presente invenção, refere-se às condições específicas de armazenamento, alimentação, bebida e meio ambiente que são aplicadas nos animais da população de animais. É preferível que os animais sejam mantidos sob condições conforme apresentado nas diretrizes da OECD para o Teste de Químicos nr 407. Além disso, as condições específicas são descritas como se segue.

i) Todos os animais da população animal são mantidos na mesma temperatura constante. Deve-se tomar cuidado de escolher uma temperatura para a execução do método da presente invenção que não estresse

os animais. De preferência, a temperatura deve ser de 20 a 24 ± 2 ° C, mais de preferência, 22 ± 2 ° C, mais de preferência, 22, 23 ou 24 ° C.

ii) Além disso, todos animais da população de animais são mantidos na mesma umidade constante. A umidade deve ser pelo menos de 70%, mas não deve exceder a 70%. Todavia, em situações excepcionais raras, (como durante a limpeza da sala ou jaula) a umidade poderá exceder a 70%. De preferência, a umidade é de 50 a 60%.

iii) Descobriu-se que a separação física dos animais da população de animais também é importante para o método da presente invenção. Assim sendo, cada animal da população de animais deve ser mantido em um espaço separado, por exemplo, uma jaula separada.

iv) Os animais da população animal são alimentados ad libitum. A comida a ser usada deve ser essencialmente isenta de contaminantes químicos ou microbianos. Os padrões a serem aplicados são apresentados no Fed. Reg. Vol. 44, no. 91, 9 de maio, 1979, p. 27354. Mais de preferência, os contaminantes microbianos, tais como bactérias, estão abaixo de 5×10^5 células/g de alimento. Tal alimento poderá ser comprado da Provimi Kliba SA Kaiseraugst (Switzerland) como o alimento "Groud Kliba mouse/rat maintenance diet", "GLP".

v) Os animais da população de animais são supridos ad libitum com um líquido de bebida. De preferência, o referido líquido é água. Todavia, outros líquidos com base aquosa poderão também ser utilizados. Tais líquidos poderão ser compostos, por exemplo, de substâncias nutritivas, vitaminas ou sais minerais, que são requeridos pelos animais. Se a água é usada como o líquido de bebida, a água deve ser isenta de contaminantes químicos e microbianos, conforme estabelecido na European Drinking Water Directive 98/83/EG.

vi) Finalmente, cada animal da população de animais deve ser submetido ao mesmo período constante de iluminação. A iluminação

constante é obtida, de preferência, através de iluminação artificial (espectro solar normal). O período de iluminação é de 12 h de luz seguido por 12 h de escuridão. Então, o período de iluminação é iniciado outra vez. Um período preferido de iluminação, portanto, é de 12 h de luz, das 6:00 às 18:00 e 12 h de escuridão, das 18:00 às 6:00 hr.

As condições de acomodação mencionadas anteriormente podem ser aplicadas a animais utilizando-se um espaço de estocagem comum para as gaiolas contendo os animais separados fisicamente. O referido espaço comum de armazenagem poderá ser uma sala ou um prédio para animais. Mantendo-se todos os animais da população na mesma sala, umidade, temperatura e período de iluminação constantes podem ser facilmente obtidos, regulando-se estes parâmetros para a sala ou para o prédio inteiro. O controle dos parâmetros, de preferência, é auxiliado por automação e os parâmetros são monitorados constantemente.

O termo "primeiro período de tempo suficiente para a aclimatização" deve ser entendido que os animais da população de animais devem ser mantidos nas condições de acomodação de específicas mencionadas anteriormente durante um período de tempo que permita a sincronização das atividades metabólicas dos animais, de forma que os animais sejam aclimatizados e tenham essencialmente o mesmo metaboloma. Especificamente, o referido primeiro período de tempo deve ser suficientemente longo para permitir que todos os indivíduos da população adotem o mesmo ritmo circadiano e de digestão de alimentos, ou períodos de imobilidade/movimentação. Além disso, o primeiro período de tempo deve permitir que cada animal ajuste os seus parâmetros bioquímicos e fisiológicos em resposta às condições ambientais aplicadas, tais como a umidade e a temperatura. De preferência, o referido primeiro período de tempo tem uma duração de 5 a 10 dias, mais de preferência, 6 a 8, e mais de preferência, 7 dias.

Nos estudos nos quais se baseia a presente invenção, com surpresa, descobriu-se que uma população de animal tendo essencialmente o mesmo metaboloma, pode ser produzida pelo método da presente invenção. Os resultados superiores alcançados pelo referido método, no entanto, dependem da obediência estrita das condições de acomodação mencionadas anteriormente e do critério para a compilação da população de animais, i.e., a compilação com respeito à idade dos animais da população de animais. A última consideração é especialmente surpreendente porque de acordo com a Diretriz nr 407 da OECD, loc. cit., deve-se tomar cuidado com relação ao peso ou ao sexo, quando escolhendo ou compilando animais para fins analíticos. Vantajosamente, utilizando-se o método da presente invenção, é possível gerar uma população de animais que pode ser aplicada para metabolômicos comparativos. Por causa do metaboloma essencialmente idêntico, é possível estudar-se com confiabilidade e eficiência, por exemplo, os efeitos tóxicos de compostos ou determinar-se os modos de ação de compostos, tais como fármacos ou candidatos a fármacos. Além disso, o método da presente invenção pode ser facilmente implementado em instalações de animais já existentes e é portanto efetivo em custo.

A presente invenção também inclui um método para a identificação de um composto que efetua um metaboloma de um animal, que é composto de:

- a) produção de uma população de animais, utilizando as etapas do método de acordo com a reivindicação 1;
- b) administrar à referida população de animais um composto que se supõe efetue o metaboloma de um animal; e
- c) analisar o metaboloma da população de animais da etapa b).

O termo "identificação" conforme utilizado aqui, significa que o método da presente invenção deve ser aplicado para a identificação ou a seleção de compostos que efetuem o metaboloma de um animal. Assim sendo,

prevê-se que o método fornecerá dados que permitirão a identificação de um composto que efetua o metaboloma de um animal. Tais dados poderão ser obtidos através de várias técnicas para a análise do metaboloma de um animal descritas em detalhes abaixo. Os dados poderão estar na forma de dados brutos ou dados processados. De preferência, o resultado da análise do metaboloma na forma de dados brutos ou de dados processados será comparado com os dados correspondentes obtidos de uma referência. Assim sendo, deve-se entender que a identificação, conforme usado de acordo com o método da presente invenção, poderá requerer etapas adicionais. Todavia, estas etapas adicionais se referem a técnicas bem conhecidas em análise comparativa, incluindo aquelas mencionadas anteriormente e abaixo. Além disso, a identificação, conforme usado aqui, de preferência inclui a identificação da propriedade dos compostos para a obtenção de um efeito no metaboloma de um animal, em princípio, independentemente do tipo de efeito ou modo de ação. Além disso, o termo inclui ainda, de preferência, a identificação do tipo de efeito ou evento que é provocado pelo modo de ação preciso. Assim sendo, o método da presente invenção poderá também ser utilizado para a identificação de uma rota metabólica específica influenciada por um composto ou um certo modo de ação de um composto. Mais de preferência, o modo para a identificação descrito acima e abaixo poderá ser utilizado para

O termo "composto que efetua um metaboloma de um animal" inclui todas as classes de compostos químicos. De preferência, um composto, conforme utilizado aqui, é um composto de molécula pequena, um peptídeo, um polipeptídeo, ou um polinucleotídeo. As moléculas pequenas, conforme referido de acordo com a presente invenção, incluem moléculas inorgânicas e orgânicas tendo um baixo peso molecular, de preferência, um peso molecular que é menor do que 30.000 kDa, mais de preferência, menor do que 20.000 Da, 10.000 Da, 8.000 Da, 5.000 Da, 3.000 Da, 2.000 Da, 1.000 Da ou 500 Da.

Mais de preferência, o referido composto é suspeito de ser um composto tóxico, um nutriente, um nutracêutico ou um composto terapeuticamente ativo (i.e. uma droga). Uma droga, de acordo com a presente invenção, terá um efeito terapêutico sobre o animal, i.e., ele tratará ou melhorará uma condição médica. A referida condição médica poderá ser uma doença ou distúrbio ou mal estar de um animal. A melhora ou o tratamento podem ser monitorados pela aparência ou grau dos sintomas da referida doença, distúrbio ou fraqueza. Os fármacos, de acordo com a presente invenção, também incluem precursores de fármacos, que são convertidos in vivo no fármaco terapeuticamente ativo e em compostos suspeitos de serem fármacos, i.e., candidatos a fármaco. Os peptídeos ou polipeptídios a serem usados de acordo com o método da presente invenção incluem peptídeos e polipeptídeos de ocorrência natural, assim como peptídeos e polipeptídeos artificiais. Os peptídeos e polipeptídeos de ocorrência natural podem ser obtidos a partir de todos os tipos de organismos, incluindo plantas, animais, fungos, bactérias ou vírus. Os peptídeos ou polipeptídeos artificiais podem ser gerados, por exemplo, através de técnicas aleatórias de síntese de peptídeos. Os peptídeos ou polipeptídeos preferidos para serem utilizados de acordo com a presente invenção são aqueles que influenciam diretamente ou indiretamente as atividades metabólicas ou as rotas metabólicas em um animal, de acordo com a presente invenção. Mais de preferência, os referidos polipeptídeos ou peptídeos têm um valor terapêutico, como hormônios de peptídeos, fatores de crescimento, fatores de sobrevivência, citoquinas, receptores para os referidos polipeptídeos, anticorpos ou fragmentos biologicamente ativos dos mesmos. Os polinucleotídeos a serem utilizados de acordo com o método da presente invenção são moléculas RNA ou DNA. De preferência, os referidos polinucleotídeos codificam os peptídeos ou polipeptídeos que influenciam diretamente ou indiretamente as atividades metabólicas ou as rotas metabólicas. Por exemplo, os poli- nucleotídeos adequados poderão codificar

enzimas, de preferência, aquelas das rotas metabólicas, os peptídeos ou polipeptídeos conforme especificado acima ou os peptídeos ou polipeptídeos que controlam a expressão dos peptídeos ou polipeptídeos mencionados anteriormente, tais como os fatores de transcrição. Além disso, os polinucleotídeos a serem usados no método da presente invenção como compostos poderão ser polinucleotídeos que interferem com a expressão do gene (i.e., transcrição ou translação), tais como as moléculas anti-sensoriais de RNA, os oligonucleotídeos anti-sensoriais ou RNA de interferência pequena (siRNA) a serem usados na tecnologia de interferência de RNA (RNAi).

Os compostos referidos de acordo com a presente invenção são selecionados em relação a sua capacidade de efetuar o metaboloma de um animal. Assim sendo, um composto no sentido da presente invenção alterará a composição do metaboloma de uma animal quando administrado. O referido efeito no metaboloma de um animal poderá ser um efeito qualitativo ou quantitativo. Um efeito qualitativo do metaboloma, conforme usado aqui, significa que pelo menos um metabólito do metaboloma do animal está ausente ou pelo menos um metabólito adicional está presente após a administração do composto. Um efeito quantitativo, conforme utilizado de acordo com a presente invenção, significa que a quantidade pelo menos de um metabólito é alterada, i.e., maior ou menor, após a administração do referido composto. Deve ficar entendido que um composto que efetua o metaboloma de um animal poderá também influenciar a função biológica das células, os tecidos ou os órgãos do referido animal e poderá provocar intoxicações, melhorias na saúde, fraqueza ou distúrbios da saúde.

O termo "administração" conforme usado aqui, inclui todas as técnicas pelas quais os compostos poderão ser fornecidos sistemicamente a um animal. Além disso, o termo inclui técnicas para a administração dos compostos para o sítio suspeitos de ação, como um tecido ou órgão visado em

potencial, i.e., administração tópica. Os compostos a serem administrados de acordo com a presente invenção poderão ser compostos, em uma outra composição composta de veículos adequados, tais como veículos farmacêuticos, excipientes e/ou diluentes. Exemplos de diluentes bem conhecidos incluem soluções salinas e tamponadas por fosfato, água, emulsões, tais como emulsões óleo/água, vários tipos de agentes de umidificação, soluções estéreis, etc. A administração dos compostos das composições adequadas mencionadas anteriormente poderá ser efetuada por diversos meios, por exemplo, através de administração intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, intramuscular, tópica, intra- dérmica, intra-nasal ou intra-bronquial. De preferência, a administração é feita através de administração oral, mais de preferência, o composto é misturado com o líquido de bebida ou com o alimento. Tratamentos e regimes de dosagem adequados são bem conhecidos pela pessoa adestrada na arte e um tratamento e regime de dosagem preferido é descrito nos exemplos. De preferência, os animais da população e os animais de teste (i.e., a população animal para a qual o composto deve ser administrado) são subdivididos pelo menos em um grupo de machos e pelo menos um grupo de fêmeas e pelo menos um grupo de dosagem elevada e pelo menos um de dosagem baixa.

O termo "analisando o metaboloma" conforme usado de acordo com a presente invenção, refere-se a técnicas para analisar quantitativamente ou qualitativamente o metaboloma. Em uma primeira etapa, a referida análise qualitativa ou quantitativa do metaboloma é composta da determinação qualitativa e quantitativa da composição do metaboloma, i.e., os metabólitos. Meios e métodos para a análise qualitativa do metaboloma são compostos daqueles que são capazes de determinar a presença ou ausência dos metabólitos compostos pelo metaboloma. Os meios e os métodos para analisar quantitativamente o metaboloma são aqueles que determinam a quantidade dos referidos metabólitos. Deve-se entender que existem meios e

métodos que poderão determinar a presença ou ausência, assim como a quantidade de metabólitos, e portanto, permitem uma combinação de análise qualitativa e quantitativa. Além disso, de acordo com os métodos da presente invenção, não é necessariamente requerido determinar-se os metabólitos inteiros do metaboloma. Ao contrário, a análise do metaboloma poderá ser executada determinando-se a presença ou ausência ou a quantidade de uma porção de metabólitos definidos como característicos, um conjunto predeterminado de metabólitos, ou um perfil metabólico para o metaboloma. Os metabólitos característicos ou predeterminados são compostos de metabólitos conhecidos assim como os assim chamados desconhecidos conhecidos. Os últimos metabólitos são aqueles meramente conhecidos pelo seu sinal, por exemplo no espectro de massa. A natureza química dos referidos desconhecidos conhecidos, no entanto, não é conhecida com precisão. Um perfil metabólico, conforme utilizado aqui, refere-se a qualquer tipo de identificador único para um certo metaboloma, i.e., uma impressão digital de um metaboloma. A análise qualitativa ou quantitativa do metaboloma, de preferência, é executada utilizando-se técnicas de análise de compostos. Os dispositivos adequados para tal determinação de compostos são bem conhecidos na arte. De preferência, a espectrometria de massa é utilizada em cromatografia gasosa espectrometria de massa específica (GC-MS), espectrometria de massa cromatografia líquida (LC-MS), espectrometria de massa de infusão direta ou espectrometria de massa de ressonância de ciclotrone de íons de transformada de Fourier (FT-ICR-MS), espectrometria de massa de eletroforese capilar (CE-MS), cromatografia líquida de alto desempenho acoplada a espectrometria de massa (HPLC-MS), espectrometria de massa quadrupolar, qualquer espectrometria de massa acoplada em sequência, como MS-MS ou MS-MS-MS, espectrometria de massa acoplada indutivamente a plasma (ICP-MS), espectrometria de massa de pirólise (Py-MS), espectrometria de massa de mobilidade de íons ou tempo

de espectrometria de massa de voo (TOF). Mais de preferência, são utilizados LC-MS e/ou GC-MS conforme descrito em detalhes abaixo. Ver técnicas conforme apresentado, por exemplo, em Nissen, *Journal of Chromatography A*, 703,1995: 37 - 57, US 4.540.884 ou US 5.397.894, o teor da apresentação das quais é incorporado aqui como referência. Como uma alternativa ou além das técnicas de espectrometria de massa, as seguintes técnicas poderão ser utilizadas para a determinação do composto: ressonância magnética nuclear (NMR), imagem de ressonância magnética (MRI), análise de infravermelho de transformada de Fourier (FT-IR), espectroscopia de ultra violeta (UV), índice de refração (RI), detecção fluorescente, detecção rádio-química, detecção eletroquímica, difusão de luz (LS), espectroscopia dispersiva de Raman ou detecção de ionização de chama (FID). Estas técnicas são bem conhecidas pela pessoa adestrada na arte e podem ser aplicadas sem problemas.

Em uma outra etapa, a análise do metaboloma conforme usado aqui, de preferência, inclui uma comparação dos metabólitos, quantidades de metabólitos ou o perfil metabólico em relação a uma referência correspondente. A referida referência poderá ser derivada de uma análise de metaboloma de uma população de animal, a qual não foram administrados compostos suspeitos de efetuarem o metaboloma de um animal, dessa forma sendo preferido que esta população de animal de referência tenha sido tratada de forma semelhante. Outras referências adequadas adicionais para uma comparação de acordo com a presente invenção poderão ser derivadas de uma análise do metaboloma de animais aos quais foram administrados compostos que se sabe que efetuam o metaboloma. Tais compostos poderão ser compostos que são tóxicos ou que são ativos terapeuticamente, através de um modo conhecido de ação. Assim sendo, utilizando-se como referência animais tratados com os compostos mencionados anteriormente que são conhecidos como efetuando o metaboloma, poderá se determinar se um composto novo

tem um efeito no metaboloma em geral. Além disso, poderá ainda ser determinado se o referido composto novo provoca efeitos tóxicos ou pode ser terapeuticamente ativo através de um certo modo de ação ou ter pelo menos o potencial para fazer isso. De preferência, os dados resultantes de uma análise

5 de metaboloma das referências descritas anteriormente são guardados e apresentados na forma de um banco de dados adequado. Além disso, os dados de uma análise de metaboloma executada pelo método da presente invenção para compostos novos, poderão também servir como referência para outros compostos novos e poderão ser guardados e apresentados também pelo

10 referido banco de dados para análise posterior. A comparação, conforme usado aqui, inclui a comparação dos dados brutos obtidos pela análise do metaboloma ou qualquer tipo de dados processados derivados dos referidos dados brutos. Meios e métodos adequados para a comparação de dados são bem conhecidos na arte e incluem, por exemplo, a análise do componente

15 principal (PCA) ou “partially least square tests (PLS)”. Em princípio, qualquer teste estatístico que permita determinar se os metabólitos, as quantidades dos mesmos ou um perfil metabólico conforme descrito acima são significativamente diferentes entre animais diferentes ou os momentos de determinação, é adequado para se executar a comparação referida aqui. As

20 diferenças mencionadas anteriormente podem, em princípio, ser determinadas através de algoritmos de reconhecimento de padrão, algoritmos de teste estatístico e/ou algoritmos multivariados, por exemplo, a análise do componente principal (PCA), a análise do componente simples (SCA), a análise do componente independente (ICA), a regressão do componente

25 principal (PCR), “Partial Least Squares (PLS)”, a análise discriminante (PLS-DA), máquinas do vetor suporte (SVM), redes neurais, redes “Bayesian”, redes de aprendizado “Bayesian”, informação mútua, redes de retropropagação, redes de alimentação simétrica para a frente, mapas de auto-organização (SOMs), algoritmos genéticos, “Hierarchical ou M-Mean

Clustering”, Anova, Test-t de estudantes, Teste Kruskal-Wallis, Teste Mann Whitney, Teste Tukey-Kramer ou Teste Hsu's Best. O processamento de dados conforme referido acima, de preferência, poderá incluir uma etapa de validação dos dados. Na referida etapa de validação dos dados, os dados inconsistentes são excluídos de uma análise posterior. Os dados inconsistentes poderão resultar de problemas técnicos durante a determinação qualitativa ou quantitativa da composição do metaboloma. Assim sendo, prevê-se que os parâmetros técnicos dos dispositivos utilizados para a determinação são constantemente monitorados e produzidos para validação de dados em um banco de dados adequado. Uma validação adicional dos dados poderá ser feita através de ferramentas internas de validação que avaliam estatisticamente cada valor medido ou parâmetro de um conjunto de dados. Por exemplo, se espectrometria de massa é utilizada para a análise do metaboloma, é gerado um conjunto de dados brutos compostos de picos. Os referidos picos aparecem em uma certa posição em um espaço tridimensional consistindo de uma faixa de tempo de retenção, uma faixa de intensidade e uma faixa da relação massa/carga (m/z). Cada um dos referidos picos poderá ser validado e confirmado através de algoritmos de validação de picos, tais como o ChemStation (Agilent Technologies, USA), Analyst (MDS SCIEX, Canadá) ou o AMDIS (NIST, USA).

Além disso, os dados relativos aos animais ou o seu armazenamento poderão ser levados em conta para a validação dos dados. Por exemplo, se as condições de armazenamento variam, o metaboloma de um animal da população de animais poderá ser influenciado adversamente. Tal metaboloma de um animal influenciado adversamente poderá, no entanto, provocar resultados falsos positivos ou negativos. Assim sendo, é preferível monitorar-se também os dados relacionados com o animal ou o armazenamento, conforme descrito abaixo em detalhes, e levar em conta estes dados durante a validação de dados.

Além disso, o processamento de dados, de preferência, inclui a normalização dos dados brutos com relação às referências internas. Por exemplo, os picos que podem ser alocados a metabólitos conhecidos poderão ser utilizados para normalizar os picos de metabólitos desconhecidos dentro de um conjunto de dados obtido para um metaboloma de um indivíduo da população de animais com relação, por exemplo, à intensidade do sinal.

Além disso, o processamento de dados poderá ser ainda requerido para criar dados coerentes, através da conversão de dados em um formato, a conversão de dados em um formato unitário comum e/ou reduzindo dimensionalmente os dados. Os dados poderão ainda ser integrados, pelo fato da informação relativa à amostra ou ao animal serem alocados na mesma. Na patente WO 03/046798 são apresentados meios e métodos adequados para a criação de tais dados coerentes, a apresentação da qual é incorporada aqui como referência.

As etapas de processamento de dados e a comparação referida acima, de preferência, são auxiliadas por automação, por exemplo, através de um programa adequado de computador que funciona em um dispositivo de computador. O dispositivo de computador, de preferência, é ligado operativamente aos vários bancos de dados referidos de acordo com a presente invenção. Assim sendo, em uma realização, a presente invenção também se refere a um banco de dados ou sistema de banco de dados que é composto dos resultados obtidos pelo método da presente invenção. Mais de preferência, tal banco de dados ou sistema de banco de dados é composto de informação relativa ao metaboloma obtido de compostos que são suspeitos de efetuarem o metaboloma de um organismo, tais como compostos tóxicos ou terapeuticamente ativos (i.e., fármacos). Assim sendo, o banco de dados poderá ser utilizado como uma ferramenta (banco de dados de referência) para a seleção de ensaios que visam a identificação de novos fármacos ou compostos tóxicos, através do seu modo de ação refletido pelo metaboloma.

Deve ser entendido que a análise do metaboloma deve ser executada depois de um período de tempo suficiente para permitir que o composto penetre nas suas células, tecidos ou órgãos efetores, i.e., um período de tempo de incubação. Em outras palavras, a análise deve ser executada após o composto tornar-se bio-disponível. Dependendo da natureza química do composto, a pessoa adestrada na arte saberá qual o período de tempo que será suficiente para a bio-disponibilidade do referido composto. Tal período de tempo também pode ser definido em uma experiência piloto. Por exemplo, um composto sendo de natureza química semelhante ou idêntica poderá ser ligado a uma identificação detectável. O referido composto identificado poderá então ser administrado a um animal. O tempo até que a identificação se torne detectável nas células, tecidos, ou órgãos efetores suspeitos, será determinado e servirá como um período de tempo de incubação para o método da presente invenção.

A análise do metaboloma, de preferência, também é composta da obtenção de uma amostra de cada animal da população de animais que será adicionalmente analisada conforme descrito anteriormente. Amostras adequadas incluem células, tecidos ou órgãos do animal ou de fluidos do corpo, incluindo sangue, plasma, soro, urina, fluido da espinha. É bem conhecida na arte, a forma pela qual tais amostras podem ser obtidas. Técnicas adequadas incluem a amostragem de sangue, biópsia, amostragem do fluido, escolha de células, etc. Uma programação preferida para a amostragem é descrita nos exemplos. A amostra poderá ser submetida a tratamentos prévios. Tais tratamentos prévios incluem a digestão enzimática de material biológico, que não é adequado para a análise do metaboloma, procedimentos de extração para obtenção de certos metabólitos da amostra, fracionamento da amostra, por exemplo, para se obter frações de metabólitos polares e/ou não polares, ou derivatização dos metabólitos, por exemplo, antes da cromatografia. As referidas técnicas de tratamento prévio são bem

conhecidas na arte e podem ser aplicadas pela pessoa adestrada na arte sem qualquer problema.

Vantajosamente, devido à produção da população de animais de acordo com a presente invenção, pode ser executada uma análise comparativa confiável do metaboloma. Os resultados da referida análise confiável de acordo com o método da presente invenção acelerará a descoberta de fármacos e as avaliações toxicológicas. De preferência, são criados bancos de dados compostos de dados metabólicos (i.e., dados sobre a composição qualitativa e quantitativa de metaboloma ou de perfis metabólicos) para um modo de ação de um composto ou dados metabólicos que refletem a administração de compostos tóxicos ou fármacos. Os dados metabólicos dos referidos bancos de dados podem ser usados como referências quando se utiliza o método da presente invenção para uma seleção de outros compostos suspeitos de efetuar o metaboloma. Prevê-se que cada seleção produzirá uma visão mais compreensiva sobre os modos de ação. Além disso, através de comparação com os referidos dados metabólicos (dados de referência) os compostos tóxicos ou os compostos terapeuticamente ativos podem ser identificados rapidamente. De preferência, o método da presente invenção é executado na forma de produção elevada.

Em uma realização preferida do método da presente invenção, a população de animais é mantida durante um segundo período de tempo após a administração à população de animais do composto suspeito de efetuar o metaboloma na etapa b) nas condições de armazenamento descritas e referidas acima.

Mais de preferência, a análise da etapa c) é executada pelo menos durante o referido segundo período de tempo ou pelo menos três vezes durante o segundo período de tempo, onde a segunda e qualquer análise adicional é executada depois de um período de tempo que é duas vezes o período de tempo decorrido da análise anterior. Mais de preferência, a

primeira análise é executada 7 dias após a administração do composto na etapa b).

5 Descobriu-se, no estudo que é a base da presente invenção, que é vantajoso avaliar-se o metaboloma ao longo de uma faixa de tempo dos efeitos agudos até os de longo prazo, incluindo os pontos intermediários. Assim sendo, o método da presente invenção permite medições repetidas durante uma investigação. Assim sendo, a análise dos animais, de preferência, é executada pelo menos uma vez, de preferência, duas vezes, ou mais de preferência, pelo menos três vezes durante o segundo período de tempo. Os
10 pontos para a análise devem ser selecionados para incluir os efeitos agudos iniciais, assim como os efeitos crônicos ou de longo prazo.

Momentos adequados para análise podem ser determinados pela pessoa adestrada na arte, dependendo do animal que é analisado sem problemas. Especificamente, se é utilizada uma população de animais
15 roedores, como uma população de ratos ou camundongos, é preferível um período de tempo de análise no qual a segunda e qualquer análise adicional seja executada depois de um período de tempo que é duas vezes o período de tempo da análise anterior, i.e., se a primeira análise é feita 7 dias após a administração do composto, a segunda análise deve ser feita após 14 dias e a
20 terceira análise deve ser feita após 28 dias da administração. De preferência, se a análise é feita analisando-se uma amostra de fluido do corpo, como o sangue, é preferível que os animais da população de animais sejam mantidos durante um período de jejum (i.e., retirada de alimentos) em torno de 16 a 20 h antes da amostragem de sangue. Além disso, a execução da análise durante
25 uma janela de tempo constante permite compensar alterações metabólicas que poderão ser causadas, por exemplo, pelo ritmo circadiano dos animais da população de animais. Assim sendo, é preferível que a amostragem de sangue e a análise seja feita dentro de uma janela de tempo constante para todas as análises. De preferência, a análise, incluindo a amostragem, é feita entre 7.30

e 10.30 a.m. Além disso, os métodos da presente invenção poderão ainda incluir, além da análise do metaboloma de sangue, outras investigações do metaboloma de órgãos diferentes ou de fluidos do corpo dos animais da população de animais.

5 Além disso, além das investigações do metaboloma, o método poderá ser composto de outras investigações que não se referem ao metaboloma. Especificamente, prevê-se que cada animal da população de animais será investigado patologicamente depois da análise metabólica ser completada. A referida investigação inclui a necropsia dos animais, incluindo
10 o exame cuidadoso da superfície externa do corpo, todos os orifícios, as cavidades do crânio, torácica e abdominal e o seu conteúdo. Além disso, por exemplo, uma análise patológica do fígado, rins, adrenais, testículos, epidídimo, timo, bexiga, cérebro, e coração deve ser executada conforme apropriado e conforme descrito na diretriz nr 407, loc.cit. Além disso, o
15 exame histopatológico deve ser executado, de preferência, conforme descrito no que se segue:

As considerações seguintes devem se preservadas no meio de fixação mais apropriado, tanto para o tipo de tecido como para o exame histopatológico subsequente pretendido; e todas as lesões grosseiras, do
20 cérebro (regiões representativas incluindo o cérebro, cerebelo e pontes), coluna, estômago, intestino delgado e grosso, (incluindo placas de Peyer), fígado, rins, adrenais, bexiga, coração, timo, tiróide, traquéia e pulmões (preservados através de enchimento com fixativo e então imersão) gônadas, órgãos sexuais acessórios (por exemplo, útero, próstata), bexiga urinária,
25 nódulos linfáticos (de preferência, um módulo linfático cobrindo a rota de administração de outro distante da rota de administração, para cobrir os efeitos sistêmicos), nervos periféricos (ciático ou da tíbia) de preferência, próximo dos músculos, e uma seção da medula do osso (ou, alternativamente, um aspirado de medula de osso montada recentemente). A descoberta clínica

e outras descobertas poderão sugerir a necessidade de se examinar tecidos adicionais. Qualquer órgão também considerado como sendo possivelmente órgãos visados, com base nas propriedades conhecidas do composto de teste, devem ser conservados.

5 Além disso, também é preferível que os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais da população de animais sejam determinados. É preferível que os dados relativos à patologia e os parâmetros hematológicos assim como os bioquímicos sejam guardados em um banco de dados adequado para cada um dos animais da população de animais, como
10 dados relacionados aos animais. Os dados guardados, de preferência, são utilizados para a avaliação dos dados metabólicos gerados pela análise do metaboloma e/ou para o processamento de dados. Em uma realização preferida do método da presente invenção, levando-se em conta estes dados relacionados com os animais, é possível evitar-se resultados positivos ou
15 negativos falsos, porque os animais que apresentarem uma patologia anormal, hematologia ou parâmetros bioquímicos anormais, em comparação com os seus paralelos, poderão ser excluídos da avaliação de dados durante o processamento de dados. Além disso, é ainda preferível incluir-se os dados relacionados com os animais relativos ao peso do corpo, consumo de
20 alimentos, consumo de líquidos de bebida e sinais clínicos, assim como anormalidades possíveis que aparecem quando os animais são mantidos pelo primeiro e pelo segundo período de tempo, conforme especificado acima.

Assim sendo, em outra realização preferida do método da presente invenção, o referido método é ainda composto da monitoração do
25 peso do corpo, consumo de alimentos, consumo de líquidos de bebida e sinais clínicos da população do animal. A referida monitoração poderá, de preferência, ser auxiliada por automação e os dados monitorados sobre o peso do corpo, consumo de alimentos, consumo de líquido de bebida e ciência clínica são recolhidos em um banco de dados para cada um dos animais da

população de animais.

Além disso, a luz do que foi mencionado anteriormente, o método da presente invenção, de preferência, é composto da monitoração de anormalidades para cada animal da população de animais. O termo "anormalidades" conforme utilizado aqui, refere-se a anormalidades que podem ser facilmente detectadas pelo pessoal de manutenção, i.e., anormalidades que usualmente não requerem a monitoração através de um médico. Mais de preferência, as anormalidades são monitoradas automaticamente e os dados obtidos da referida monitoração são armazenados em um banco de dados para cada indivíduo da população de animais.

Conforme já mencionado acima, em uma realização preferida do método da presente invenção, a referida análise é composta da comparação do metaboloma da população de animais com uma referência.

Mais de preferência, a comparação é composta da geração de um perfil metabólico do metaboloma dos animais da população de animais e a comparação do referido perfil com uma referência. Mais de preferência, uma diferença nos perfis metabólicos é indicativa de um composto que efetua o metaboloma de um animal. Deve ser entendido que a referência nesta realização mais preferida é um perfil metabólico derivado de um animal não tratado.

O termo "perfil metabólico" significa que uma marca específica é estabelecida durante a análise para cada metaboloma de um animal da população de animais. O referido perfil metabólico poderá ser derivado pelo menos de um sinal (por exemplo, um pico no espectro de massa) obtido de um animal ou uma amostra do mesmo através do método da presente invenção. Mais de preferência, um perfil metabólico é derivado de uma quantidade de tais sinais. Os sinais poderão ser obtidos de um só metabólito ou de uma quantidade de metabólitos. Deve ser entendido que os sinais principais poderão ser adicionalmente processados por técnicas

adequadas, conforme descrito acima. De preferência, é gerado um conjunto de dados tridimensionais utilizando-se pelo menos uma vez uma técnica de separação e recolocação em solução e pelo menos uma técnica de separação e recolocação da massa em solução. Tal conjunto de dados poderia ser obtido, por exemplo, por cromatografia acoplada com espectrometria de massa, conforme descrito acima. Tal conjunto de dados tridimensionais poderá ser analisado através de algoritmos convencionais de determinação de picos, como o ChemStation ou o AM-DIS, que permite a detecção específica do máximo e/ou mínimo no referido conjunto de dados tridimensionais. O máximo e o mínimo assim obtidos serão o perfil metabólico específico para um certo metaboloma de animal de uma população de animais. Além disso, os sinais obtidos, tais como o máximo e o mínimo dos picos poderão ser adicionalmente processados em valores característicos como uma função dos respectivos tempo e massa. Deve ser entendido que os perfis metabólicos gerados pelas técnicas mencionadas anteriormente consistem, de preferência, de um conjunto de dados que são dimensionalmente reduzidos, e portanto, podem ser facilmente comparados uns com os outros através de testes estatísticos, incluindo a análise do componente principal (PCA) ou os “partial least square tests (PLS)”. Uma diferença no perfil metabólico de um metaboloma de um animal de teste (i.e., um animal que obteve um composto suspeito de efetuar o metaboloma de um animal) e uma referência é um indicador de que o composto, na realidade, induz alterações metabólicas no animal de teste. Todavia, conforme já descrito acima, isto não necessariamente significa que a composição quantitativa do metaboloma (i.e., o número de compostos que estão presentes) será alterado. As alterações nos perfis metabólicos poderão também ser um indicador para uma composição quantitativa alterada do metaboloma (i.e., a quantidade de compostos que estão presentes é alterada). Mais de preferência, os perfis metabólicos poderão ser comparados com perfis metabólicos compostos de um banco de dados

com perfis de referencia para fármacos conhecidos, pró-drogas ou compostos tóxicos e os seus modos de ação. Vantajosamente, o método da presente invenção permite portanto procedimentos de seleção para fármacos e candidatos a fármacos mais eficientes no tempo, porque os efeitos tóxicos ou prejudiciais dos compostos poderão ser determinados em um estágio preliminar do desenvolvimento do fármaco. Além disso, os testes de toxicidade podem ser executados facilmente de uma forma eficiente no tempo, porque o início dos eventos tóxicos pode ser monitorado pelas alterações dos perfis metabólicos. Especialmente, isto é vantajoso para compostos que provocam efeitos tóxicos a longo prazo ao invés de efeitos imediatos.

Deve ser entendido que diferenças ou alterações no metaboloma de um animal também podem ser analisadas através da comparação de metabólitos específicos de natureza química conhecida ou desconhecida, ao contrário de um perfil metabólico.

Assim sendo, em outra realização preferida do método da presente invenção, a comparação é composta da comparação com pelo menos um metabólito do metaboloma da população de animais com uma referência. Mais de preferência, uma diferença no referido pelo menos único metabólito é indicativa do composto que efetua o metaboloma de um animal. Deve ser entendido que a referência nesta realização mais preferida é um perfil metabólico derivado de um animal que não é tratado.

Em outra realização preferida do método da presente invenção, e a luz do que foi mencionado anteriormente, o referido composto é um composto suspeito de ser tóxico ou um composto suspeito de ser uma droga.

A presente invenção se refere ainda a um método para a identificação de um marcador para um composto que efetua o metaboloma de um animal, composto das etapas do método da presente invenção, conforme descrito anteriormente e a etapa adicional de produção de um marcador para o

referido composto, com base na análise do metaboloma. Em uma realização preferida do método da presente invenção, o referido marcador é um perfil metabólico da população de animais que é alterado, em comparação com uma referência. Mais de preferência, o referido marcador indica a toxicidade de um composto, um modo de ação de um composto ou uma atividade terapêutica de um composto.

Além disso, a presente invenção inclui um método para a identificação de um composto que efetua o metaboloma de um animal, composto da análise metabólica de uma amostra de pelo menos um animal de uma população de animais, para os quais foi administrado um composto suspeito de efetuar o metaboloma e onde a referida população de animais foi mantida nas condições de armazenamento referidas anteriormente, antes e após a administração do composto.

O termo "análise metabólica" conforme usado aqui, de preferência, inclui todos os meios, métodos e realizações descritas anteriormente para a análise do metaboloma de uma animal.

O termo "amostra", conforme usado aqui, inclui amostras de material biológico obtidas do animal a ser investigado. Fontes adequadas para as amostras já foram descritas acima.

Em uma realização preferida do método da presente invenção, a referida análise é composta da comparação do metaboloma da amostra de um animal da referida população de animais com uma referência.

Mais de preferência, a comparação é composta da geração de um perfil metabólico para a amostra de um animal da população de animais e a comparação do referido perfil com uma referência. Mais de preferência, uma diferença no perfil metabólico é indicativa de um composto que efetua o metaboloma de um animal. Deve-se entender que a referência nesta realização preferida é um perfil metabólico derivado de um animal que não é tratado.

Também mais de preferência, a comparação é composta da

comparação pelo menos de um metabólito do metaboloma da amostra de um animal da população de animais com uma referência. Mais de preferência, uma diferença no referido pelo menos metabólito é indicativa de um composto que efetua o metaboloma de uma animal. Deve ser entendido que a

5 referência nesta realização mais preferida é um perfil metabólico derivado de um animal não tratado.

Também é incluído na presente invenção um método para a identificação de um marcador para um composto que efetua o metaboloma de um animal, compreendendo as etapas do método mencionado anteriormente

10 (baseado em amostras) e a etapa adicional de fornecer o referido marcador com base na análise do metaboloma.

Em uma realização preferida do referido método da presente invenção, o referido marcador é um perfil metabólico ou pelo menos é um metabólito do metaboloma da amostra de um animal da população de animais

15 que é alterada, em comparação com uma referência. Mais de preferência, o referido marcador indica a toxicidade de um composto, um modo de ação de um composto ou uma atividade terapêutica de um composto.

A invenção será agora ilustrada pelos exemplos seguintes. No entanto, os exemplos são meramente para fins de ilustração e não significam

20 limitar o escopo da invenção.

Exemplo 1: Manutenção do animal

Os ratos da família CriGlxBriIHan:Wi foram comprados da Charles River, Sulzfeld, Germany, tendo uma idade de 63 a 65 dias. Cada animal foi marcado através de uma tatuagem na orelha, consecutivamente. Os

25 animais foram mantidos nas seguintes condições de armazenagem:

Condições do ar:	Temperatura 20 - 24 ° C, com umidade
	30 - 70%
	Quaisquer desvios foram
	documentados.

	Período de iluminação:	12 h de luz de 6.00 a 18.00 h, 12 h de escuridão de 18:00 a 6:00 horas
	Tipo de gaiola:	Gaiolas metálicas, tipo DK III, BECKER & Co., Castrop-Rauxel, Germany
5	Nr. de animais por gaiola:	1
	Tipo de dieta:	Dieta de manutenção moída Kliba mouse/rat "GLP", refeição, fornecida pelas Provimi Kliba SA, Kaiseraugst (Switzerland), ad libitum
10	Fornecimento de água:	Água potável ad libitum
	Aclimatização:	Durante o período de aclimatização de 7 dias, os animais foram acostumados às condições do ambiente do estudo e à dieta.
15		

Exemplo 2: Investigação metabólica dos compostos de testes

Ratos wistar machos e fêmeas foram escolhidos aleatoriamente e alocados para grupos de doses antes do início do período de administração, com base nos seus pesos. Os animais foram tratados com 5 compostos de testes diferentes com níveis de dose elevados e baixos, de acordo com o seguinte programa mostrado na tabela 1.

Tabela 1:

Grupo de dose	Substância do teste	Nível da dose (ppm na dieta)	Número de animais por sexo	Número de animais	
				Machos	Fêmeas
00	0	0	10	1-10	61-70
01	A	Dose baixa	5	11-15	71-75
02	A	Dose alta	5	16-20	76-80
03	B	Dose baixa	5	21-25	81-85
04	B	Dose alta	5	26-30	86-90
05	C	Dose baixa	5	31-35	91-95
06	C	Dose alta	5	36-40	96-100
07	D	Dose baixa	5	41-45	101-105
8	D	Dose alta	5	46-50	106-110
09	E	Dose baixa	5	51-55	111-115
10	E	Dose alta	5	56-60-	116-120

A amostragem de sangue foi executada conforme indicado no seguinte programa de tempo mostrado na tabela 2.

Tabela 2:

Data	Fase do estudo/exame	Data do estudo
	Data do início da experiência: chegada dos animais e início do período de aclimatização	-6
	Escolha aleatória de animais	
	Início do período de administração	0
	Amostragem de sangue ¹⁾²⁾	7
	Amostragem de sangue ¹⁾²⁾	14
	Amostragem de sangue ¹⁾²⁾ e necropsia	28
	Preparação da amostra de sangue	
	Avaliação das descobertas clínicas	
	Resumo dos resultados clínicos	

1) = Período de jejum antes do exame de sangue/necropsia (retirada de alimentação) de cerca de 16 a 20h

2) = entre 7:30 e 10:30

5 Durante a experiência, foi feita uma verificação para os animais moribundos e mortos duas vezes, diariamente de segunda-feira até sexta-feira e uma vez diariamente no sábado, domingo e feriados públicos. Os animais foram verificados diariamente em relação a quaisquer sinais clínicos anormais. As anormalidades e alterações serão documentadas para cada animal. O consumo de alimentos foi determinado no estudo nos dias 6, 13, 20 e 27. O consumo de água potável foi verificado diariamente de acordo com as observações gerais. O peso do corpo foi determinado durante o período de administração, nos dias do estudo 0, 6, 13, e 20 e 27. A ingestão média diária das substâncias de teste foi calculada com base nos valores individuais para o peso do corpo e o consumo de alimentos. As médias e os desvios standard foram calculados utilizando-se o teste de Dunnet.

A amostragem de sangue foi executada como se segue:

20 Antes da necropsia ou amostragem do sangue, a alimentação foi interrompida em torno de 16 a 20h (período de jejum). A amostragem de sangue foi feita entre 7:30 e 10:30 a.m. O sangue foi retirado do plexo venoso retroorbital de animais anestesiados com isoflurane. Foi retirado de cada animal 1 ml de sangue em tubos plásticos com EDTA como anticoagulante

(10 microlitros de uma solução a 10%). As amostras de sangue são centrifugadas. O plasma de cada amostra é separado e transferido para outro tubo plástico. Os eritrócitos precipitados são lavados três vezes com NaCl 0,9%, e completados até 1 ml com água destilada estéril (Ampuwa® Fresenius, Bad Homburg, Germany) para hemolizar as células vermelhas do sangue. A hemoglobina é determinada nas amostras de sangue hemolizadas (40 microlitros de hemolizato mais 160 microlitros de NaCl 1,5%) com um analisador automático (ADVIA 120, Bayer AG, Fernwald, Germany). O sangue, plasma e hemolizato são amostrados e estocados em tubos Eppendorf originais. O transporte e a preparação das amostras é feito sob resfriamento com gelo. No final da preparação da amostra, todas as amostras são cobertas com uma atmosfera de nitrogênio puro, seladas com "Parafilm M" e estocadas a -80 ° C (sob atmosfera de nitrogênio) até o processamento das amostras (por exemplo, o embarque).

Depois do término da experiência, foi determinada a patologia clínica para cada animal. Para este fim todos os animais que sobreviveram ao estudo foram sacrificados por decapitação com anestesia de isoflurane (se era previsto a amostragem final de sangue), ou por anestesia com CO₂.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a produção de uma população de animais mamíferos tendo um metaboloma essencialmente idêntico, caracterizado pelo fato de ser composto de:

5 a) compilação de uma população de animais mamíferos tendo essencialmente a mesma idade;

b) manutenção da referida população de animais mamíferos da etapa a) durante um primeiro período de tempo suficiente para a aclimatização nas seguintes condições de armazenamento:

10 i) temperatura constante;

ii) umidade constante;

iii) separação física dos mamíferos da população de mamíferos;

15 iv) alimentação ad libitum, onde o alimento a ser alimentado é essencialmente isento de contaminantes químicos ou microbianos;

v) bebida ad libitum, onde o líquido de bebida é essencialmente isento de contaminantes químicos ou microbianos;

vi) período de iluminação constante; e

20 c) produção da população de animais mamíferos da etapa b) depois do referido primeiro período de tempo.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da referida população de animais mamíferos ser uma população de roedores.

25 3. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato do referido roedor ser um rato ou camundongo.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato da referida idade estar entre a faixa de $X \pm 1$ dia, onde X é a idade prevista da população.

5. Método para a identificação de um composto que efetua o

metaboloma de um animal, caracterizado pelo fato de ser composto de:

a) produção de uma população de animais mamíferos, utilizando as etapas do método como definido na reivindicação 1;

5 b) administração à referida população de animais mamíferos de um composto suspeito de resultar o metaboloma de um mamífero; e
c) análise do metaboloma da população de animais mamíferos da etapa b).

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato da população de animais mamíferos ser mantida durante um
10 segundo período de tempo após a administração à população de animais mamíferos de um composto suspeito de ser tóxico na etapa b), nas condições de armazenagem descritas na reivindicação 1.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato da análise da etapa c) ser executada pelo menos uma vez durante o
15 referido segundo período de tempo.

8. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato da análise da etapa c) ser executada pelo menos três vezes durante o referido segundo período de tempo, onde a segunda e qualquer análise adicional é executada após um período de tempo que é duas vezes o período
20 de tempo decorrido desde a análise anterior.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato da primeira análise ser executada 7 dias após a administração do composto na etapa b).

10. Método, de acordo com qualquer das reivindicações 5 a 9, caracterizado pelo fato de ser ainda composto da monitoração do peso do corpo, consumo de alimentos, consumo de líquidos de bebida e sinais clínicos da população de mamíferos.
25

11. Método, de acordo com qualquer das reivindicações 5 a 10, caracterizado pelo fato de ser ainda composto da monitoração de

anormalidades para cada animal da população de animais.

12. Método, de acordo com qualquer das reivindicações 5 a 11, caracterizado pelo fato da análise ser composta da comparação do metaboloma da população de animais mamíferos com uma referência.

5 13. Método, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato da comparação ser composta da geração de um perfil metabólico para o metaboloma de um mamífero da população de animais mamíferos, e a comparação do referido perfil com uma referência.

10 14. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato da diferença entre os perfis metabólicos ser indicativa de um composto que efetua o metaboloma de um mamífero.

15 15. Método, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato da comparação ser constituída da comparação de pelo menos um metabólito do metaboloma de um mamífero da população de animais mamíferos com uma referência.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato da diferença no referido pelo menos único metabólito ser indicativa de um composto que efetua o metaboloma de um mamífero.

20 17. Método, de acordo com qualquer das reivindicações 5 a 16, caracterizado pelo fato do referido composto ser um composto suspeito de ser tóxico ou um composto suspeito de ser uma droga.

25 18. Método para a identificação de um marcador para um composto que efetua o metaboloma de um mamífero, caracterizado pelo fato de ser composto das etapas do método como definido em qualquer das reivindicações 5 a 17 e a etapa adicional de produção de um marcador para o referido composto, com base na análise do metaboloma.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato do referido marcador ser um perfil metabólico ou ser pelo menos um metabólito de um mamífero da população de animais mamíferos que é

alterado, em comparação com a referência.

20. Método, de acordo com as reivindicações 18 ou 19, caracterizado pelo fato do referido marcador indicar toxicidade de um composto, um modo de ação de um composto ou uma atividade terapêutica de um composto.

21. Método para a identificação de um composto que efetua o metaboloma de um mamífero, caracterizado pelo fato de ser composto da análise metabólica de uma amostra de pelo menos um mamífero de uma população de animais mamíferos para os quais foi administrado um composto suspeito de efetuar o metaboloma de um mamífero, e onde a referida população de animais mamíferos foi mantida antes e após a administração do composto nas condições de armazenamento descritas na reivindicação 1.

22. Método, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato da referida análise ser composta da comparação do metaboloma da amostra de um mamífero da referida população de animais mamíferos com uma referência.

23. Método, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato da comparação ser composta da geração de um perfil metabólico para a amostra de um animal da população de animais mamíferos, e a comparação do referido perfil com uma referência.

24. Método, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato da diferença no perfil metabólico ser indicativa de um composto que efetua o metaboloma de um mamífero.

25. Método, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato da comparação ser composta da comparação de pelo menos um metabólito do metaboloma de uma amostra de uma população de animais mamíferos com uma referência.

26. Método, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato da diferença no referido pelo menos único metabólito ser indicativa

de um composto que efetua o metaboloma de um mamífero.

27. Método, de acordo com qualquer das reivindicações 21 a 26, caracterizado pelo fato do referido composto ser um composto tóxico ou uma droga.

5 28. Método para a identificação de um marcador para um composto que efetua o metaboloma de um mamífero, caracterizado pelo fato de ser composto das etapas do método como definido em qualquer das reivindicações 21 a 26, e da etapa adicional de produção do referido marcador, com base na análise do metaboloma.

10 29. Método, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato do referido marcador ser um perfil metabólico ou ser pelo menos um metabólito do metaboloma da amostra de um mamífero da população de animais mamíferos que é alterado, em comparação com uma referência.

15 30. Método, de acordo com as reivindicações 28 ou 29, caracterizado pelo fato do referido marcador ser indicativo da toxicidade de um composto, um modo de ação de um composto ou uma atividade terapêutica de um composto.

RESUMO

“MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE UMA POPULAÇÃO DE ANIMAIS MAMÍFEROS TENDO UM METABOLOMA ESSENCIALMENTE IDÊNTICO, PARA A IDENTIFICAÇÃO DE UM COMPOSTO QUE EFETUA O METABOLOMA DE UM ANIMAL, E PARA A IDENTIFICAÇÃO DE UM MARCADOR PARA UM COMPOSTO QUE EFETUA O METABOLOMA DE UM MAMÍFERO”

A presente invenção refere-se a um método para a produção de uma população de animais tendo um metaboloma essencialmente idêntico, composto de uma população de animais que são essencialmente da mesma idade, mantendo a referida população de animais durante um período de tempo suficiente para aclimatização nas seguintes condições de armazenamento: (i) temperatura constante, (ii) umidade constante, (iii) separação física dos animais da população de animais, (iv) alimentação ad libitum, onde a comida a ser alimentada é essencialmente isenta de contaminação química ou microbiana, (v) bebida ad libitum, onde o líquido de bebida é essencialmente isento de produtos químicos ou contaminação microbiana, (vi) período constante de iluminação, e disponibilidade da população de animais após o referido período de tempo. Além disso, a presente invenção refere-se a métodos para a identificação de um composto que efetua o metaboloma de um animal, ou a métodos para a identificação de um marcador de tais compostos. Além disso, a presente invenção inclui métodos para a identificação de tais compostos ou marcadores dos mesmos, compreendendo a análise metabólica de uma amostra de pelo menos um animal de uma população de animais.