



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 037**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02791794 .7**

96 Fecha de presentación : **09.12.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1458888**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.09.2004**

54 Título: **Métodos de tratamiento de psicosis y esquizofrenia basados en polimorfismos del gen del CNTF.**

30 Prioridad: **10.12.2001 US 339835 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.08.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.08.2011**

73 Titular/es: **NOVARTIS AG.**  
**Lichtstrasse 35**  
**4056 Basel, CH**

72 Inventor/es: **Kudaravalli, Sridhar y**  
**Polymeropoulos, Mihael, Hristos**

74 Agente: **Mir Plaja, Mireia**

ES 2 364 037 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos de tratamiento de psicosis y esquizofrenia basados en polimorfismos del gen del CNTF.

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La presente invención pertenece a los campos de la farmacología, la medicina y la química medicinal y proporciona métodos para tratar patologías psicóticas incluyendo la esquizofrenia y patologías relacionadas. En particular, este invento se refiere a la utilización del análisis genómico para determinar la capacidad de respuesta de un paciente a la iloperidona y métodos para determinar estrategias de tratamiento óptimas.

**Descripción del arte relacionado**

15 El factor neurotrófico ciliar (CNTF) era conocido originalmente como un factor de supervivencia para neuronas ciliares de pollo in vitro, pero más recientemente ha demostrado ser un factor de supervivencia para diferentes tipos de células neuronales. El CNTF está involucrado en la prevención de la degeneración de axones motores y pertenece a la familia de citoquinas interleucina-6. Barbin et al. emplearon un ensayo de supervivencia para neuronas obtenidas a partir de ganglios ciliares de embrión de pollo para informar sobre la actividad neurotrófica de CNTF derivado de ojo de pollo. Véase, Barbin, G et al., J. Neurochem. 43:1468-1478,1984. También se mostró en este estudio que el CNTF actúa sobre neuronas simpáticas y sensoriales.

20 El gen del CNTF también ofrece esperanzas para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y otros trastornos similarmente relacionados. En ratones pmn/pmn homocigotos ocurre un trastorno en el que los miembros posteriores tienen una neuropatía motora progresiva que llega a ser evidente al final de la tercera semana posnatal. Todos los ratones mueren entre las seis y siete semanas postparto por parálisis respiratoria. Sendtner et al. trataron a los ratones con CNTF y lograron mejorar la función motora y redujeron los síntomas morfológicos de degeneración neural incluso en aquellos casos en los que ya estaban presentes alteraciones degenerativas. Véase Sendtner et al., Nature 358: 502-504, 1992.

25 Un mejor entendimiento se consiguió cuando la expresión del gen del CNTF fue eliminada en ratones mediante recombinación homóloga y todavía tenían lugar la atrofia progresiva y la pérdida de neuronas motoras, acompañadas de una ligera reducción de la fuerza muscular, véase Masu et al. Nature 365: 27-32, 1993. Los autores de este estudio declararon que estos resultados demuestran que la expresión del gen no es esencial para el desarrollo de neuronas motoras espinales determinado mediante criterios morfológicos, pero que es esencial para el mantenimiento de la función en neuronas motoras durante el período posnatal.

40 Takahashi et al. obtuvieron hallazgos similares en la falta de efectos en los ratones knockout con CNTF inactivado. Ellos hallaron que aproximadamente un 2,5% de la población japonesa son homocigotos para mutaciones que inactivan el gen del CNTF, véase Takahashi et al. Nature Genet. 7: 79-84, 1994. Los que carecen de CNTF parecen no ser afectados adversamente y no han mostrado ningún tipo de defectos neurológicos relacionados.

45 Las subunidades del receptor de CNTF comparten secuencias similares con el receptor de la leptina (LEP). Una serie de estudios sugieren que las citoquinas CNTF y LEP tienen la capacidad de transmitir señales a los centros de saciedad hipotalámicos. Estos resultados se consiguieron tras administración sistémica de CNTF y LEP a ratones ob/ob, lo que llevó a la inducción rápida del gen de respuesta primaria tis-11 en el núcleo arcuato. Cuando ratones ob/ob carentes de una leptina funcional fueron tratados con CNTF, la obesidad, hiperfagia e hiperinsulinemia asociadas con la deficiencia de leptina fueron reducidas. A diferencia de la leptina, el CNTF también redujo fenotipos relacionados a la obesidad en ratones db/db, que carecen de un receptor de leptina funcional, así como en ratones con obesidad inducida por dieta, que son parcialmente resistentes a las acciones de la leptina.

50 La proteína CNTF es almacenada en el interior de las células gliales adultas, esperando quizás su liberación mediante algún mecanismo provocado por lesiones. Puede ser que no sea esencial para el desarrollo y que, de hecho, actúe en respuesta a lesiones o cualquier otro tipo de estrés. El CNTF fue caracterizado como factor trófico para neuronas motoras en el ganglio ciliar y el cordón espinal.

**Polimorfismo en el gen del CNTF**

60 Un polimorfismo en el gen CNTF ha sido identificado. El gen del CNTF está localizado en 11q12.2 y el polimorfismo es 103 G>A en la secuencia GenBank X55890 (Versión 1) (véase PubMed: 9285965). Una mutación en un sitio aceptor de empalme causó un corte y empalme incorrecto del ARNm, suprimiendo de este modo la expresión de la proteína CNTF. El cambio de nucleótidos fue una transición de G a A en la posición -6 del sitio receptor de empalme, conduciendo a un desplazamiento del marco de lectura desde el aminoácido 39, teniendo como resultado un codón de parada 24 aminoácidos corriente abajo. Se asumía que el ARNm irregular codificaba una proteína truncada de 62 aminoácidos de largo (FS63 TER).

El análisis de muestras de tejido y la transfección de minigenes CNTF en células cultivadas demostraron que el alelo mutado expresaba solamente la especie de ARNm mutada. El gen mutante homocigoto no es traducido a proteína, lo que es mostrado por el hallazgo de que los anticuerpos que reconocen tanto el CNTF normal como el mutado presentan una falta total de inmunoreactividad frente a CNTF en tejido nervioso periférico de un sujeto mutante homocigoto. Véase Takahashi et al. *Nature Genet.* 7: 79-84, 1994.

Tanaka Yuji et al. ('Schizophrenic psychoses and the CNTF null mutation', *NEUROREPORT*, vol. 9, no. 6, 20 Abril 1998 (1998-04-20), páginas 981-983) revela la asociación entre una mutación nula en el gen del factor neutrófico ciliar (CNTF) y las psicosis funcionales, incluyendo la esquizofrenia y trastornos esquizoafectivos.

## Trastornos psicóticos

Las psicosis causan consecuencias emocionales y económicas tremendas en los pacientes, sus familias y la sociedad en su conjunto. Las patologías psicóticas, tales como la esquizofrenia y los trastornos relacionados (p.ej. el trastorno esquizoafectivo), e incluyendo los trastornos afectivos (trastornos de estado de ánimo) con síntomas psicóticos (p.ej. el trastorno bipolar) son enfermedades complejas y heterogéneas de etiología incierta que afligen a un alto porcentaje de todas las poblaciones a escala mundial.

La esquizofrenia está caracterizada por tener tanto "síntomas positivos" (alucinaciones, delirios y desorganización conceptual) como "síntomas negativos" (apatía, aislamiento social, afecto y pobreza del habla). La actividad anormal del neurotransmisor dopamina es una característica de la esquizofrenia. La actividad dopaminérgica es reducida en el sistema mesocortical (resultando en síntomas negativos) y es aumentada en el sistema mesolímbico (resultando en síntomas positivos o psicóticos). Varios otros neurotransmisores están involucrados, incluyendo la serotonina, el glutamato y el ácido gamma-aminobutírico (GABA).

Los fármacos antipsicóticos, de una forma u otra, han sido desde hace mucho tiempo la base del tratamiento de los trastornos psicóticos. Estos fármacos a veces son usados en combinación con una medicación reguladora del estado de ánimo tales como el litio o un antidepresivo. Durante muchos años, la esquizofrenia fue tratada con fármacos antipsicóticos clásicos, los neurolépticos, que bloquean los receptores centrales de la dopamina. Los neurolépticos son efectivos para el tratamiento de los síntomas positivos de la esquizofrenia, pero tienen poco o ningún efecto sobre los síntomas negativos. La capacidad de estos fármacos para antagonizar los receptores de la dopamina se correlaciona con la eficacia antipsicótica. Los fármacos neurolépticos incluyen las fenotiazinas incluyendo los alifáticos (p.ej., la clorpromazina), las piperidinas (p.ej., la tioridazina) y las piperazinas (p.ej., la flufenazina); las butirofenonas (p.ej., el haloperidol); los tioxantenos (p.ej., el flupentixol); las oxoindolinas (p.ej. la molindona); las dibenzoxazepinas (p.ej., la loxapina) y las difenilpiperidinas (p.ej., la pimozida).

Desafortunadamente, los síntomas negativos resistentes a los neurolépticos son responsables de la mayoría de las discapacidades social y laboral causadas por la esquizofrenia. Además, los neurolépticos causan síntomas extrapiramidales, incluyendo rigidez, temblor, bradicinesia (lentitud del movimiento) y bradifrenia (lentitud del pensamiento) así como las discinesias tardías y las distonías. Para el tratamiento de la psicosis con medicaciones, véase *Textbook of Psychopharmacology*, Schatzberg AF and Nemeroff CB, Editors, American Psychiatric Press. Wash. D.C. 1995.

Se ha conseguido un progreso en el tratamiento de patologías psicóticas mediante la introducción de agentes antipsicóticos nuevos, atípicos. El perfil de efectos secundarios de estos antipsicóticos atípicos es muy superior al de los agentes tradicionales. Los antipsicóticos atípicos son una clase diferente de fármacos antipsicóticos que tienen un perfil de unión al receptor y una efectividad diferentes contra los síntomas de la esquizofrenia. El rasgo esencial de un antipsicótico atípico es menos síntomas extrapiramidales agudos, especialmente distonías, asociados con la terapia en comparación con un antipsicótico típico tal como el haloperidol. La clozapina, el antipsicótico atípico prototípico, se diferencia de los antipsicóticos típicos con las características siguientes: (1) mayor eficacia en el tratamiento de la psicopatología general en pacientes con esquizofrenia no respondedores a los antipsicóticos típicos; (2) mayor eficacia en el tratamiento de los síntomas negativos de la esquizofrenia; y (3) aumentos menos frecuentes y cuantitativamente menores en las concentraciones de la prolactina sérica asociados con la terapia (Beasley, et al., *Neuropsychopharmacology*, 14(2), 111-123, (1996)).

Los antipsicóticos atípicos unen los receptores centrales de serotonina2 (5-HT2) además de los receptores de dopamina D2. A diferencia de los neurolépticos, mejoran los síntomas negativos como también los síntomas positivos. Causan mínimos síntomas extrapiramidales y raramente causan discinesias tardías, acatisias o reacciones distónicas agudas. El primer fármaco antipsicótico atípico aprobado para el tratamiento de la esquizofrenia fue la clozapina. La clozapina es efectiva para el tratamiento de la esquizofrenia, especialmente para sujetos que no responden a la terapia neuroléptica tradicional.

Kelleher J. P. et al. ('Advances in atypical Antipsychotics for the treatment of schizophrenia new formulations and new agents' *CNS drugs*, adis international, Auckland, NZ, vol. 16, no. 4, 2000, páginas 249-261) revisa la información sobre agentes antipsicóticos atípicos.

El tratamiento de trastornos psicóticos con agentes antipsicóticos ha mejorado continuamente a lo largo de los años. No obstante, hasta ahora no ha habido ningún medio, aparte de ensayo y error, para determinar qué pacientes responderán a un agente antipsicótico y qué nivel de dosis un paciente determinado podrá requerir para producir una respuesta terapéutica sin efectos secundarios graves. Como todos los agentes antipsicóticos, incluso los atípicos más recientes, tienen efectos secundarios significativos incluyendo síntomas extrapiramidales, tales como rigidez, temblor, bradicinesia (lentitud del movimiento) y bradifrenia (lentitud del pensamiento) así como las discinesias tardías y las distonías, este período de "ensayo y error" pudo requerir mucho tiempo, ser desagradable e incluso peligroso para el paciente y aumentó la probabilidad de incumplimiento. Estos efectos secundarios y tóxicos dependen de la dosis. Por lo tanto hay una gran necesidad de desarrollar medios para determinar si un paciente responderá a un agente antipsicótico o no y qué rango de dosis será efectivo en un paciente particular minimizando los efectos secundarios.

#### Resumen de la invención

La presente invención responde a esta necesidad proporcionando métodos para determinar la capacidad de respuesta de un paciente que sufre o es susceptible de sufrir un trastorno psicótico, incluyendo pero no limitado a la esquizofrenia y los trastornos del estado de ánimo con síntomas psicóticos, comprendiendo determinar para las dos copias del gen del CNTF presentes en el individuo, la identidad de los nucleótidos en el sitio polimórfico 103 G>A, (el gen del CNTF está localizado en 11q12.2 el polimorfismo es 103 G>A en la secuencia GenBank X55890 (Versión 1)). Esta variación nucleotídica resulta en la creación de un sitio aceptor de empalme nuevo, un ARNm alterado y una proteína aberrante resultante (FS63 TER), véase Pub Med ID No. 9285965. La determinación del tratamiento está basada en el conocimiento de que si ambos nucleótidos son G entonces el individuo será respondedor al tratamiento con iloperidona. Si un par de nucleótidos es A y uno es G cabe esperar que el individuo será menos respondedor a las medicaciones antipsicóticas, incluyendo pero no limitadas a la iloperidona y podrá requerir una dosis más alta o una terapia adyuvante además de, o en vez de la iloperidona. Basándose en esta información, al individuo se le puede administrar una cantidad efectiva de una medicación antipsicótica apropiada diseñada para minimizar los efectos secundarios y para maximizar la respuesta y el cumplimiento del paciente.

Se revela un método para tratar un trastorno psicótico en un paciente que necesita dicho tratamiento que comprende determinar para las dos copias del gen del CNTF presentes en el individuo la identidad de los nucleótidos en el sitio polimórfico 103 G>A en la secuencia GenBank con No. de referencia X55890 (Versión 1), donde, si ambos nucleótidos son G entonces el individuo es tratado con iloperidona y donde, si un nucleótido es A y uno es G entonces el individuo es tratado con una terapia alternativa o con iloperidona en combinación con una terapia alternativa.

Asimismo, se proporciona un método para tratar un trastorno psicótico en un paciente que necesita dicho tratamiento que comprende ensayar para determinar la presencia de la proteína CNTF en los fluidos o tejidos corporales de dichos pacientes, donde, si la proteína CNTF es hallada en niveles normales, indicando el genotipo GG, el paciente es tratado con iloperidona, y si la proteína CNTF es hallada en niveles intermedios el paciente es tratado con una terapia alternativa o con iloperidona en combinación con una terapia alternativa.

Asimismo, se proporciona un método para tratar un trastorno psicótico en un paciente que necesita dicho tratamiento que comprende detectar un nivel de expresión ARNm correspondiente a la variante G del gen del CNTF en el sitio polimórfico 103 G>A en la secuencia GenBank con No. de referencia X55890 (Versión 1), detectar un nivel de expresión del ARNm correspondiente a la variante A del gen del CNTF en el sitio polimórfico 103 G>A en la secuencia GenBank con No. de referencia X55890 (Versión 1), comparar los niveles de ARNm detectados en los puntos anteriores (a) y (b) donde, si (a) es dos o más veces el valor de (b), el paciente es tratado con iloperidona (medicación antipsicótica), y si (a) y (b) son de valor similar, el paciente es tratado con una terapia alternativa o con iloperidona en combinación con una terapia alternativa.

Asimismo, se proporciona un método para elegir sujetos para la inclusión en un estudio clínico de una medicación antipsicótica que comprende determinar para las dos copias del gen del CNTF presentes en el individuo, la identidad de los nucleótidos en el sitio polimórfico 103 G>A en la secuencia GenBank con No. de referencia X55890 (Versión 1), donde el individuo es incluido en el estudio si ambos nucleótidos son G, y el individuo es excluido del estudio si un par de nucleótidos es A y uno es G.

Asimismo, se revela un kit a utilizar para determinar la estrategia de tratamiento para un paciente con un trastorno psicótico, que comprende un anticuerpo capaz de reconocer y unirse al producto de expresión polipeptídico del gen del CNTF, un recipiente apto para contener dicho anticuerpo y una muestra de fluido corporal de dicho individuo donde el anticuerpo puede contactar con el polipéptido CNTF si está presente, y medios para detectar la combinación de dicho anticuerpo con el polipéptido CNTF, y también incluye instrucciones para la utilización del kit.

Asimismo, se revela un kit a utilizar para determinar la estrategia de tratamiento para un paciente con un trastorno psicótico que comprende un polinucleótido capaz de reconocer y unirse al producto de expresión ARNm del gen del CNTF, un recipiente apto para contener dicho polinucleótido y una muestra de fluido corporal de dicho individuo donde dicho polinucleótido puede contactar con el ARNm del CNTF, si está presente, y medios para detectar la

combinación de dicho polinucleótido con el ARNm del CNTF y también incluye instrucciones para la utilización del kit.

5 Asimismo, se revela un kit a utilizar para determinar la estrategia de tratamiento para un paciente con un trastorno psicótico que comprende un polinucleótido capaz de reconocer y unirse a alguna parte de la secuencia de ADN del gen del CNTF, un recipiente apto para contener dicho polinucleótido y una muestra de fluido corporal de dicho individuo donde el polinucleótido puede contactar con la secuencia de ADN del CNTF si está presente, y medios para detectar la combinación de dicho polinucleótido con la secuencia de ADN del CNTF e incluye instrucciones para la utilización del kit.

10 Esta invención proporciona un método para determinar la capacidad de respuesta de un individuo con un trastorno psicótico al tratamiento con iloperidona, que comprende determinar, para las dos copias del gen del CNTF presentes en el individuo, la identidad de un nucleótido en el sitio polimórfico en CNTF 103 G>A en la secuencia GenBank con No. de referencia X55890 (Versión 1); y asignar el individuo a un grupo de buenos respondedores si los nucleótidos en el sitio polimórfico en 103 G>A indican que, en el sitio polimórfico CNTF en 103 G>A, ambos nucleótidos son G y a un grupo de escasa respuesta si dichos nucleótidos indican que uno es A y uno es G en el sitio CNTF 103 G>A.

15 Asimismo, un kit para la identificación del patrón de polimorfismo de un paciente en el sitio polimórfico CNTF en 103 G>A es revelado, comprendiendo dicho kit un medio para determinar un patrón de polimorfismo genético en el sitio polimórfico del CNTF en 103 G>A.

Asimismo, se revela un kit descrito en el párrafo precedente, que además comprende un medio de recolección de muestras de ADN.

20 Asimismo, un kit descrito en los párrafos precedentes es revelado, en el que los medios para determinar un patrón de polimorfismo genético en el sitio polimórfico del CNTF en 103 G>A comprenden al menos un oligonucleótido para la genotipificación del CNTF.

25 Asimismo, un kit de acuerdo con los párrafos precedentes es revelado, en el que los medios para determinar un patrón de polimorfismo genético en el sitio polimórfico del CNTF en 103 G>A comprenden dos oligonucleótidos para la genotipificación del CNTF.

Asimismo, un kit según queda descrito en los párrafos precedentes es revelado, en el que los medios para determinar un patrón de polimorfismo genético en el sitio polimórfico del CNTF en 103 G>A comprenden al menos una composición cebadora de genotipificación del CNTF que comprende al menos un oligonucleótido para la genotipificación del CNTF.

30 Asimismo, un kit según lo descrito en los párrafos precedentes es revelado, en el que la composición cebadora para la genotipificación del CNTF comprende al menos dos juegos de pares de cebadores alelo-específicos.

Asimismo, un kit de acuerdo con los párrafos precedentes es revelado, en el que los dos oligonucleótidos para la genotipificación del CNTF están empaquetados en recipientes separados.

35 Asimismo, se revela un método, en el que un kit de acuerdo con las realizaciones anteriormente mencionadas es utilizado para determinar para las dos copias del gen del CNTF presentes en el individuo la identidad de los nucleótidos en el sitio polimórfico 103 G>A en la secuencia GenBank con No. de referencia X55890 (Versión 1) y/o para determinar, para las dos copias del gen del CNTF presentes en el individuo, la identidad de un nucleótido en un sitio polimórfico en la región del gen del CNTF que está en desequilibrio de ligamiento con el sitio polimórfico en CNTF 103 G>A en la secuencia GenBank con No. de referencia X55890 (Versión 1).

40 Asimismo, un kit para la identificación de la expresión ARNm del gen del CNTF es revelado, comprendiendo dicho kit un medio para determinar el producto ARNm del gen del CNTF.

Asimismo, un kit descrito en el párrafo precedente es revelado, en el que el medio para determinar el producto ARNm del gen del CNTF comprende un polinucleótido capaz de unirse al producto de expresión ARNm del gen del CNTF.

45 Asimismo, un kit para la identificación de la expresión ARNm del gen del CNTF de acuerdo con los párrafos precedentes es revelado, en el que el medio para determinar el producto ARNm del gen del CNTF comprende al menos un polinucleótido específico de una de las variantes del gen del CNTF en el sitio polimórfico 103 G>A.

50 Asimismo, un kit para la identificación de la expresión ARNm del gen del CNTF es revelado, en el que el polinucleótido es específico de la expresión ARNm de la variante G del gen del CNTF en el sitio polimórfico 103 G>A.

Asimismo, un kit para la identificación de la expresión ARNm del gen del CNTF es revelado, en el que el polinucleótido es específico de la expresión ARNm de la variante A del gen del CNTF en el sitio polimórfico 103 G>A.

- Asimismo, un kit de acuerdo con los párrafos precedentes es revelado, en el que el polinucleótido es específico de la codificación de ARNm irregular para una proteína truncada de 62 aminoácidos.
- 5 Asimismo, un kit para la identificación de la expresión ARNm del gen del CNTF de acuerdo con lo descrito en las reivindicaciones precedentes es proporcionado, en el que el polinucleótido está bloqueando el producto de expresión ARNm de la variante G o A del gen del CNTF bajo condiciones de hibridación estrictas.
- 10 Asimismo, un kit para la identificación de la expresión ARNm del gen del CNTF según lo descrito en las reivindicaciones precedentes es revelado, en el que los medios para determinar el producto ARNm del gen del CNTF comprende al menos dos polinucleótidos, donde un polinucleótido es específico de la expresión ARNm de la variante G del gen del CNTF en el sitio polimórfico 103 G>A, y el otro polinucleótido es específico de la expresión ARNm de la variante A del gen del CNTF en el sitio polimórfico 103 G>A.
- Asimismo, un kit descrito en el párrafo precedente es revelado, en el que los dos polinucleótidos están empaquetados en recipientes separados.
- 15 Asimismo, un método es revelado, en el que una de las realizaciones anteriormente mencionadas para la identificación de la expresión ARNm del gen del CNTF de la invención es utilizada o para (a) detectar un nivel de expresión ARNm correspondiente a la variante G del gen del CNTF en el sitio polimórfico 103 G>A en la secuencia GenBank con No. de referencia X55890 (Versión 1), y/o (b) detectar un nivel de expresión ARNm correspondiente a la variante A del gen del CNTF en el sitio polimórfico 103 G>A en la secuencia GenBank con No. de referencia X55890 (Versión 1).
- 20 Asimismo, se revela un kit para la identificación del nivel de proteína CNTF de un paciente que comprende un medio para detectar el producto de expresión polipeptídico del gen del CNTF.
- Asimismo, un kit descrito en el párrafo precedente es revelado, en el que el medio comprende un anticuerpo que reconoce el polipéptido del CNTF.
- Asimismo, un kit de acuerdo con el párrafo precedente es revelado, en el que la unión del anticuerpo está dentro de un rango de KD de  $10e-6$  a  $10e-13$ , preferible dentro de un rango de  $10e-8$  a  $10e-12$ .
- 25 Asimismo, un método es revelado, en el que uno de los kits anteriormente mencionados para la identificación del nivel de proteína CNTF de un paciente es utilizado para ensayar para determinar la presencia de la proteína CNTF en los fluidos o tejidos corporales del paciente.
- Asimismo, un kit de acuerdo con las reivindicaciones precedentes es revelado, que además comprende un medio para recoger una muestra de fluido corporal o de tejido.
- 30 Asimismo, se revela un método para tratar un trastorno psicótico en un paciente que necesita dicho tratamiento, un método para elegir sujetos para la inclusión en un estudio clínico de una medicación antipsicótica, o un método para determinar la capacidad de respuesta de un individuo con un trastorno psicótico al tratamiento con iloperidona, donde dicho método es realizado ex vivo.
- Breve discusión de los dibujos
- 35 La figura 1 muestra el cambio de porcentaje medio en GG TOTPANSS y no-GG TOTPANSS según lo discutido en el Ejemplo 1.
- Descripción de las realizaciones preferidas
- 40 La invención proporciona métodos para determinar la capacidad de respuesta de un individuo con un trastorno psicótico al tratamiento con iloperidona. Estos métodos comprenden determinar el genotipo o haplotipo del gen del CNTF y hacer la determinación de la capacidad de respuesta basándose en la presencia o ausencia de una o más variantes polimórficas en el gen del CNTF. El gen del CNTF está localizado en 11q12.2 y el polimorfismo es 103 G>A en la secuencia GenBank X55890 (Versión 1). Esta variación nucleotídica resulta en la creación de un sitio aceptor de empalme nuevo, un ARNm alterado y una proteína aberrante resultante, véase Pub Med ID No. 9285965.
- 45 La detección de estos polimorfismos puede ser utilizada para determinar o predecir la capacidad de respuesta del individuo a un agente antipsicótico particular, a saber a la iloperidona. Además, los polimorfismos se pueden detectar directamente o mediante la detección del ARNm característico de la variante polimórfica del gen a diferencia del tipo más común del CNTF.
- 50 Por añadidura, la detección del producto de expresión polipeptídico (proteína) del gen del CNTF en los fluidos o tejidos corporales puede ser utilizada para determinar la presencia o ausencia del polimorfismo, y el nivel relativo del producto de expresión polipeptídico puede ser utilizado para determinar si el polimorfismo está presente en un estado homocigoto o heterocigoto y por tanto la capacidad de respuesta del paciente a los agentes antipsicóticos.

Por ello, se revela un método para la determinación de la presencia o ausencia del polimorfismo en un paciente mediante la identificación de la presencia del producto de expresión proteico del gen del CNTF. Estudios demuestran que el ARNm de la variante A no es traducido a un producto de expresión polipeptídico. Por ello, si cantidades normales de la proteína es hallada en los fluidos corporales o las muestras de tejido del paciente entonces se asume que el paciente tiene la variante homocigota G, que es más común, y responderá a los agentes antipsicóticos. Si el nivel de expresión de la proteína CNTF no es detectable entonces se supone que el paciente tiene el polimorfismo homocigoto A. Sin embargo, si se observa que el paciente tiene un nivel intermedio de la proteína en los fluidos corporales o las muestras de tejido entonces se cuenta con que el paciente tiene el polimorfismo heterocigoto con un alelo que contiene G y uno que contiene A en el sitio polimórfico. En este caso se asumiría que el paciente es un no-respondedor a una medicación antipsicótica, incluyendo la iloperidona, y el tratamiento con un solo antipsicótico tal como la iloperidona no estaría indicado.

Tal como se utiliza en este documento, el término "nivel normal" cuando se utiliza en referencia al nivel del producto de expresión polipeptídico del gen del CNTF medido en un fluido corporal o tejido corporal significa que el nivel medido está dentro de una desviación estándar del nivel medio del producto de expresión polipeptídico del gen del CNTF determinado en al menos 10 individuos de los que se sabe que tienen la variante G en ambos loci en el sitio polimórfico 103 G>A en el gen del CNTF humano (en la secuencia GenBank con No. de acceso X55890 (Versión 1) cuando se determina en el mismo tipo de fluido o tejido corporales y mediante la misma técnica de ensayo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "nivel intermedio" cuando se utiliza en referencia al nivel del producto de expresión polipeptídico del gen del CNTF medido en un fluido corporal o tejido corporal significa que el nivel medido es en más de una desviación estándar inferior al nivel medio del producto de expresión polipeptídico del gen del CNTF determinado en al menos 10 individuos de los que se sabe que tienen la variante G en ambos loci en el sitio polimórfico 103 G>A en el gen del CNTF humano (en la secuencia GenBank con No. de acceso X55890 (Versión 1) cuando se determina en el mismo tipo de fluido o tejido corporales y mediante la misma técnica de ensayo.

Asimismo, se revelan métodos para determinar la capacidad de respuesta de un paciente a agentes antipsicóticos y de desarrollar estrategias de tratamiento para un paciente con un trastorno psicótico. Estos métodos comprenden medir la cantidad y proporción de los ARNm correspondientes a la variante más común del gen del CNTF, es decir, G en el sitio 103, frente a la variante polimórfica menos común con A en lugar de G. En esta realización la proporción de los dos ARNm es determinada en una muestra de fluido corporal o tejido corporal del paciente. Si todo el ARNm es de la variante G entonces el individuo será respondedor al tratamiento con agentes antipsicóticos incluyendo la iloperidona. Sin embargo, si ambos tipos de ARNm son hallados entonces el paciente es heterocigoto para el polimorfismo y se espera que será poco respondedor al tratamiento con una medicación antipsicótica, incluyendo la iloperidona y se considerarán estrategias de tratamiento alternativas.

Un experto en la materia reconocerá fácilmente que, además de los polimorfismos específicos revelados en este documento, cualquier polimorfismo que esté en desequilibrio de ligamiento con dicho polimorfismo también puede servir de marcador sustituto indicando la capacidad de respuesta al mismo fármaco o a la misma terapia como lo hace el polimorfismo de nucleótido simple (SNP) con el que está en desequilibrio de ligamiento. Por tanto, puede utilizarse cualquier SNP en desequilibrio de ligamiento con los SNP revelados en esta especificación.

#### Identificación y caracterización de SNPs

Muchas técnicas diferentes pueden usarse para identificar y caracterizar SNPs, incluyendo el análisis del polimorfismo de conformación de cadena sencilla, el análisis de heterodúplex por cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento (DHPLC), la secuenciación directa de ADN y métodos computacionales, véase Shi MM, Clin Chem 2001, 47:164-172. Gracias a la gran cantidad de información secuencial disponible en bases de datos públicas, se pueden usar herramientas computacionales para identificar SNPs in silico alineando secuencias independientemente presentadas para un gen dado (secuencias de ADNc o genómicas). La comparación de los SNPs obtenidos experimentalmente y mediante métodos in silico mostró que el 55% de los SNPs candidatos encontrados por SNPfinder(<http://pgws.nci.nih.gov:82/perl/snp/snp.cgi.pl>) también han sido descubiertos experimentalmente, véase, Cox et al. Hum Mutal 2001,17:141-150. Sin embargo, estos métodos in silico solamente fueron capaces de encontrar un 27% de SNPs verdaderos.

Los métodos más comunes de tipificación de SNPs incluyen actualmente los métodos de hibridación, de extensión de cebadores y de división. Cada uno de estos métodos tiene que ser conectado a un sistema de detección apropiado. Las tecnologías de detección incluyen la polarización fluorescente, (véase Chan X et al. Genome Res 1999, 9:492-499), la detección luminométrica de la liberación de pirofosfato (pirosecuenciación), (véase Ahmadian A et al. Anal Biochem 2000, 280:103-10), ensayos de división basados en la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET), la DHPLC y la espectrometría de masas, (véase Shi MM, Clin Chem 2001,47:164-172 y la Patente Estadounidense No. 6,300,076 B1). Otros métodos para detectar y caracterizar SNPs son los que se revelan en las Patentes Estadounidenses No. 6,297,018 B1 y 6,300,063 B1.

En una realización particularmente preferida, la detección del polimorfismo puede conseguirse por medio de la llamada tecnología INVADER™ (disponible de Third Wave Technologies Inc. Madison, Wisconsin). En este ensayo,

un oligonucleótido "invasor" específico de corriente arriba y una sonda de corriente abajo parcialmente solapante forman conjuntamente una estructura específica al unirse a un ADN molde complementario. Esta estructura es reconocida y cortada en un sitio específico por la enzima Cleavase, y ello resulta en la liberación del 5' flap del oligonucleótido-sonda. A continuación, este fragmento sirve como el oligonucleótido "invasor" con respecto a dianas secundarias sintéticas y sondas-señal secundarias etiquetadas por fluorescencia contenidas en la mezcla de reacción. Ello resulta en una división específica de las sondas sondas-señal secundarias por la enzima Cleavase. La señal de fluorescencia es generada cuando esta sonda secundaria, etiquetada con moléculas de colorante capaces de una transferencia de energía de resonancia fluorescente, es dividida. Las enzimas Cleavase tienen requisitos estrictos relativos a la estructura formada por las secuencias superpuestas de ADN o flaps y pueden, por ello, ser usadas para detectar específicamente desapareamientos de pares de bases simples inmediatamente corriente arriba del sitio de corte en la hebra de ADN corriente abajo. Véase Ryan D et al. Molecular Diagnosis Vol. 4 No 2 1999:135-144 y Lyamichev V et al. Nature Biotechnology Vol 17 1999:292-296, véase también las Patentes Estadounidenses 5,846,717 y 6,001,567.

En algunas realizaciones, una composición contiene dos o más oligonucleótidos de genotipificación diferentemente etiquetados para sondear simultáneamente la identidad de nucleótidos en dos o más sitios polimórficos. También se contempla la posibilidad de que las composiciones cebadoras puedan contener dos o más juegos de pares de cebadores alelo-específicos para permitir el direccionamiento y la amplificación simultáneos de dos o más regiones que contengan un sitio polimórfico.

Los oligonucleótidos para la genotipificación del CNTF propuestos por la invención también pueden ser inmovilizados sobre o sintetizados sobre una superficie sólida tal como un microchip, beads o una laminilla de vidrio (véase, p.ej., WO 98/20020 y WO 98/20019). Tales oligonucleótidos de genotipificación inmovilizados pueden ser usados en una variedad de ensayos de detección de polimorfismos, incluyendo pero no limitados a ensayos de hibridación con sondas y de extensión de polimerasa. Los oligonucleótidos de genotipificación del CNTF inmovilizados de la invención pueden comprender una matriz ordenada de oligonucleótidos diseñados para efectuar un cribado rápido de una muestra de ADN para identificar polimorfismos en múltiples genes al mismo tiempo.

Un cebador oligonucleotídico alelo-específico de la invención tiene un nucleótido 3' terminal, o preferentemente un nucleótido 3' penúltimo, que es complementario a solamente un nucleótido de un SNP particular, actuando así como un cebador para la extensión mediada por polimerasa solamente si está presente el alelo que contiene este nucleótido. Se contemplan cebadores de oligonucleótidos alelo-específicos (ASO) que hibridan o con la hebra codificante o con la no codificante. Un cebador ASO destinado a detectar polimorfismos del gen del CNTF podría ser desarrollado utilizando técnicas conocidas por los expertos en la materia.

Otros oligonucleótidos de genotipificación hibridan con una región diana localizada uno a varios nucleótidos corriente abajo de uno de los sitios polimórficos novedosos identificados en el presente documento. Tales oligonucleótidos son útiles en los métodos de extensión de cebadores mediada por la polimerasa para detectar uno de los polimorfismos novedosos descritos en la presente memoria, y por este motivo tales oligonucleótidos de genotipificación se denominan en el presente documento "oligonucleótidos de extensión de cebadores". En una realización preferida, el terminal 3' de un oligonucleótido de extensión de cebadores es un desoxinucleótido complementario al nucleótido localizado en posición inmediatamente adyacente al sitio polimórfico.

Asimismo, se revela un kit que comprende al menos dos oligonucleótidos de genotipificación empaquetados en recipientes separados. Este kit puede contener también otros componentes tales como un tampón de hibridación (donde los oligonucleótidos han de ser utilizados como una sonda) empaquetados en un recipiente separado. Alternativamente, donde los oligonucleótidos se han de utilizar para amplificar una región diana, el kit puede contener, empaquetados en recipientes separados, una polimerasa y un tampón de reacción optimizado para la extensión de cebadores mediada por la polimerasa, tal como la PCR.

Las composiciones de oligonucleótidos y kits arriba descritos son útiles en los métodos para genotipificar y/o haplotipificar el gen del CNTF en un individuo. Según se utilizan en el presente documento, los términos "genotipo CNTF" y "haplotipo CNTF" designan el genotipo o haplotipo que contiene el par de nucleótidos o el nucleótido, respectivamente, que está presente en uno o más de los sitios polimórficos novedosos descritos en el presente documento y pueden incluir opcionalmente también el par de nucleótidos o el nucleótido presente en uno o más sitios polimórficos adicionales en el gen del CNTF. Los sitios polimórficos adicionales pueden ser sitios polimórficos conocidos en la actualidad o sitios que son descubiertos posteriormente.

Una realización del método de genotipificación incluye aislar del individuo una mezcla de ácido nucleico que comprenda las dos copias del gen del CNTF, o un fragmento del mismo, que estén presentes en el individuo, y determinar la identidad de los nucleótidos en uno o más de los sitios polimórficos en las dos copias para asignar un genotipo CNTF al individuo. Como será entendido fácilmente por el experto en la materia, las dos "copias" de un gen en un individuo pueden ser el mismo alelo o pueden ser alelos diferentes. En una realización particularmente preferida, el método de genotipificación comprende determinar la identidad de los nucleótidos en cada sitio polimórfico.

Típicamente, la proteína o mezcla de ácido nucleico es aislada de una muestra biológica obtenida del individuo, como por ejemplo una muestra de sangre o muestra de tejido. Las muestras de tejido apropiadas incluyen sangre entera, semen, saliva, lágrimas, orina, materia fecal, sudor, frotis bucales, piel, y biopsias de tejidos de órganos específicos, tales como el tejido muscular o nervioso y pelos. La mezcla de ácido nucleico puede estar compuesta por ADN, ARNm, o ADNc, y en los dos últimos casos, la muestra biológica tiene que ser obtenida de un órgano en el que esté expresado el gen del CNTF. Además, será entendido fácilmente por el experto en la materia que las preparaciones de ARNm o ADNc no serían utilizadas para detectar polimorfismos localizados en intrones o en regiones 5' y 3' no transcritas. Si un fragmento del gen del CNTF es aislado, tendrá que contener el/los sitio(s) polimórfico(s) para ser genotipificado.

Una realización del método de haplotipificación comprende aislar del individuo una molécula de ácido nucleico que contenga solamente una de las dos copias del gen del CNTF, o un fragmento del mismo, que esté presente en el individuo, y determinar en esta copia la identidad del nucleótido en uno o más de los sitios polimórficos en esta copia para asignar un haplotipo CNTF al individuo. El ácido nucleico puede ser aislado utilizando cualquier método capaz de separar las dos copias del gen del CNTF o fragmento, incluyendo pero no limitado a uno de los métodos anteriormente descritos para preparar isogenes de CNTF, siendo el método preferido la clonación selectiva in vivo.

Como será apreciado fácilmente por los expertos en la materia, cualquier clon individual solamente proporcionará información haplotípica sobre una de las dos copias del gen del CNTF presentes en un individuo. Si se desea información haplotípica para la otra copia del individuo, será necesario que se examinen clones adicionales de CNTF. Típicamente, deberían examinarse al menos cinco clones para tener una probabilidad superior al 90% de haplotipificar ambas copias del gen del CNTF en un individuo. En una realización particularmente preferida, el nucleótido en cada de sitio polimórfico es identificado.

En una realización preferida, un par de haplotipos CNTF es determinado para un individuo identificando la secuencia fasada de nucleótidos en uno o más de los sitios polimórficos en cada copia del gen del CNTF que está presente en el individuo. En una realización particularmente preferida, el método de haplotipificación comprende identificar la secuencia fasada de nucleótidos en cada sitio polimórfico en cada copia del gen del CNTF. Al haplotipificar ambas copias del gen, el paso de identificar es realizado preferentemente colocando cada copia del gen en recipientes separados. Sin embargo, también está previsto que si las dos copias son marcadas con etiquetas diferentes, o son separadamente distinguibles o identificables mediante otros aspectos, podría ser posible en algunos casos realizar el método en el mismo recipiente. Por ejemplo, si la primera y la segunda copia del gen son etiquetadas con un primer y un segundo colorante fluorescente distintos, respectivamente, y un oligonucleótido alelo-específico etiquetado con un tercer colorante fluorescente distinto es utilizado para ensayar el/los sitio(s) polimórfico(s), entonces detectar una combinación del primer y el tercer colorante identificaría el polimorfismo en la primera copia del gen, mientras que detectar una combinación del segundo y el tercer colorante identificaría el polimorfismo en la segunda copia del gen.

Tanto en el método de genotipificación como en el método de haplotipificación, la identidad de un nucleótido (o par de nucleótidos) en un sitio(s) polimórfico(s) puede ser determinada amplificando una región/regiones diana que contiene(n) el/los sitio(s) polimórfico(s) CNTF directamente de una o ambas copias del gen del CNTF, o fragmento del mismo, y la secuencia de la región/las regiones amplificada(s) puede ser determinada por métodos convencionales. Los expertos en la materia entenderán fácilmente que solamente un nucleótido será detectado en un sitio polimórfico en aquellos individuos que son homocigotos en este sitio, mientras que dos nucleótidos diferentes serán detectados si el individuo es heterocigoto para este sitio. El polimorfismo puede ser identificado directamente, lo cual se conoce como identificación de tipo positivo, o por inferencia, lo cual se denomina identificación de tipo negativo. Por ejemplo, si se conoce que un SNP es guanina y citosina en una población de referencia, puede determinarse positivamente que un sitio o bien es guanina o citosina para todos los individuo homocigotos en este sitio, o tanto guanina como citosina, si el individuo es heterocigoto en este sitio. Alternativamente, puede determinarse negativamente que el sitio no es guanina (y, por consiguiente, citosina/citosina) o no es citosina (y, por consiguiente, guanina/guanina).

Por añadidura, la identidad del/de los alelo(s) presente(s) en cualquiera de los sitios polimórficos novedosos descritos en el presente documento puede determinarse indirectamente genotipificando un sitio polimórfico no revelado en el presente documento que esté en desequilibrio de ligamiento con el sitio polimórfico de interés. Se dice que dos sitios están en desequilibrio de ligamiento si la presencia de una variante particular en un sitio aumenta la predictibilidad de otra variante en el segundo sitio (Véase, Stevens, JC 1999, Mol Diag 4:309-317). Los sitios polimórficos en desequilibrio de ligamiento con los sitios polimórficos revelados en el presente documento pueden estar localizados en regiones del gen o en otras regiones genómicas no examinadas en la presente memoria. La genotipificación de un sitio polimórfico en desequilibrio de ligamiento con los sitios polimórficos novedosos descritos en el presente documento puede ser realizada mediante, pero no está limitada a, cualquiera de los métodos anteriormente mencionados para detectar la identidad del alelo en un sitio polimórfico.

La(s) región/regiones diana puede(n) ser amplificada(s) utilizando cualquier método de amplificación dirigido a oligonucleótidos, incluyendo pero limitados a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Patente Estadounidense No. 4,965,188), la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Barany et al., Proc Natl Acad Sci USA 88:189-193, 1991; WO 90/01069), y el ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA) (Landegren et al., Science

241:1077-1080,1988). Los oligonucleótidos útiles como cebadores o sondas en los métodos de este tipo deberían hibridizar específicamente con una región del ácido nucleico que contenga el sitio polimórfico o esté localizada en posición adyacente a él. Típicamente, los oligonucleótidos tienen una longitud de entre 10 y 35 nucleótidos y, preferentemente, de entre 15 y 30 nucleótidos. Lo más preferiblemente, los oligonucleótidos tienen 20 a 25 nucleótidos de largo. La longitud exacta del oligonucleótido dependerá de muchos factores que serán tomados en cuenta y practicados rutinariamente por el experto en la materia.

Otros procedimientos conocidos de amplificación de ácidos nucleicos pueden utilizarse para amplificar la región diana incluyendo sistemas de amplificación basados en la transcripción (Patente Estadounidense No. 5,130,238; EP 329,822; Patente Estadounidense No. 5,169,766, WO 89/06700) métodos isotérmicos (Walker et al., Proc Natl Acad Sci USA 89:392-396, 1992).

Un polimorfismo en la región diana también puede ser ensayado antes o después de la amplificación utilizando uno de varios métodos basados en la hibridización conocidos en la técnica. Típicamente, se utilizan oligonucleótidos alelo-específicos en la realización de tales métodos. Los oligonucleótidos alelo-específicos pueden ser utilizados como pares de sondas etiquetadas de forma diferente, de tal manera que un miembro del par muestra una correspondencia perfecta con una variante de una secuencia diana y el otro miembro muestra una correspondencia perfecta con una variante distinta. Puede detectarse más de un sitio polimórfico a la vez utilizando un juego de oligonucleótidos o pares de oligonucleótidos alelo-específicos. Preferiblemente, los miembros del juego tienen temperaturas de fusión con una diferencia no superior a 5°C, y más preferiblemente a 2°C entre ellos al hibridizar con cada uno de los sitios polimórficos que están siendo detectados.

La hibridización de un oligonucleótido alelo-específico con un polinucleótido diana puede realizarse con ambas entidades en solución, o tal hibridización puede ser realizada cuando o bien el oligonucleótido o el polinucleótido diana está fijado covalentemente o no covalentemente a un soporte sólido. La fijación puede ser mediada, por ejemplo, por interacciones anticuerpo-antígeno, poli-L-Lys, estreptavidina o avidina-biotina, puentes de sal, interacciones hidrofóbicas, uniones químicas, reticulación por UV, horneado, etc. Los oligonucleótidos alelo-específicos pueden ser sintetizados directamente sobre el soporte sólido o fijados al soporte sólido a continuación de la síntesis. Los soportes sólidos apropiados para la utilización en los métodos de detección objeto de la invención incluyen sustratos hechos de silicio, vidrio, plástico, papel y similares, que pueden conformarse, por ejemplo, en forma de pocillos (como en las placas de 96 pocillos), laminillas, hojas, membranas, fibras, chips, platillos, y beads. El soporte sólido puede ser tratado, revestido o derivatizado para facilitar la inmovilización del oligonucleótido alelo-específico o ácido nucleico diana.

El genotipo o haplotipo para el gen del CNTF de un individuo también puede determinarse mediante la hibridización de una muestra nucleica que contiene una o ambas copias del gen con matrices y submatrices de ácido nucleico como las que se describen en el documento WO 95/11995. Las matrices contendrían una batería de oligonucleótidos alelo-específicos representando cada uno de los sitios polimórficos a incluir en el genotipo o haplotipo.

La identidad de polimorfismos también puede determinarse utilizando una técnica de detección de desapareamientos, incluyendo pero no limitadas al método de protección de RNasa con utilización de ribosondas (Winter et al., Proc Natl Acad Sci USA 82:7575,1985; Meyers et al., Science 230:1242, 1985) y proteínas que reconocen los desapareamientos de nucleótidos, tales como la proteína mutS de E. coli (Modrich P. Ann Rev Genet 25:229-253,1991). Alternativamente, los alelos variantes pueden identificarse mediante análisis del polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP) (Orita et al., Genomics 5:874-879, 1989; Humphries et al., en Molecular Diagnosis of Genetic Diseases, R. Elles, ed., págs. 321-340, 1996) o electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) (Wartell et al., Nucl Acids Res 18:2699-2706, 1990; Sheffield et al., Proc Natl Acad Sci USA 86:232-236, 1989).

Un método de extensión del cebador mediada por la polimerasa también puede ser utilizado para identificar el/los polimorfismo(s). Varios métodos de este tipo se han descrito en la literatura de patentes y científica e incluyen el método "Genetic Bit Analysis" (WO 92/15712) así como el "genetic bit analysis" mediado por la ligasa / polimerasa (Patente Estadounidense No. 5,679,524). Otros métodos relacionados se revelan en los documentos WO 91/02087, WO 90/09455, WO 95/17676, Patentes Estadounidenses Nos. 5,302,509 y 5,945,283. Cebadores extendidos que contienen un polimorfismo pueden ser detectados por espectrometría de masas tal como se describe en la Patente Estadounidense No. 5,605,798. Otro método de extensión del cebador es la PCR alelo-específica (Ruafio et al., Nucl Acids Res 17:8392,1989; Ruafio et al., Nucl Acids Res 19, 6877-6882, 1991; WO 93/22456; Turki et al., J Clin Invest 95:1635-1641, 1995). Por añadidura, se pueden investigar múltiples sitios polimórficos mediante la amplificación simultánea de múltiples regiones del ácido nucleico utilizando juegos de cebadores alelo-específicos tal como se describe en Wallace et al. (WO 89/10414).

Además, los datos relativos a la frecuencia de haplotipos para cada grupo etnogeográfico son examinados para determinar si son consistentes con el equilibrio de Hardy-Weinberg. El equilibrio de Hardy-Weinberg (D.L. Hartl et al., Principles of Population Genomics, Sinauer Associates (Sunderland, MA), 3ra Ed., 1997) postula que la frecuencia de hallar el par de haplotipos H1/H2 es igual a  $P_H-W (H1/H2) = 2p(H1) p (H2)$  si  $H1 \neq H2$  y  $P_H-W (H1/H2) = p (H1) p (H2)$  si  $H1 = H2$ . Una diferencia estadísticamente significativa entre las frecuencias de haplotipos observadas y

esperadas podría deberse a uno o más factores incluyendo la consanguinidad significativa en el grupo de población, una fuerte presión selectiva sobre el gen, un sesgo de muestreo, y/o errores en el proceso de genotipificación. Si se observan grandes desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg en un grupo etnogeográfico, el número de individuos en este grupo puede ser incrementado para ver si la desviación se debe a un sesgo de muestreo. Si un mayor tamaño de la muestra no reduce la diferencia entre las frecuencias de pares de haplotipos observadas y esperadas, entonces podría ser deseable la opción de haplotipificar al individuo utilizando un método de haplotipificación directa tal como, por ejemplo, la tecnología CLASPER System™ (Patente Estadounidense No. 5,866,404), o la PCR alelo-específica de largo alcance (Michalotos-Beloin et al., Nucl Acids Res 24:4841-4843, 1996).

En un método destinado a predecir un par de haplotipos CNTF, el paso de asignar incluye la realización del siguiente análisis. Primero, cada uno de los posibles pares de haplotipos es comparado con los pares de haplotipos presentes en la población de referencia. Por lo general, solamente uno de los pares de haplotipos en la población de referencia corresponde a un posible par de haplotipos, y este par es asignado al individuo. En ocasiones, solamente un haplotipo representado en los pares de haplotipos de referencia es consistente con un posible par de haplotipos para un individuo, y en tales casos al individuo se le asigna un par de haplotipos que contiene este haplotipo conocido y un haplotipo nuevo derivado por sustracción del haplotipo conocido del posible par de haplotipos. En raras ocasiones, o ningún haplotipo en la población de referencia son consistentes con los posibles pares de haplotipos o, alternativamente, múltiples pares de haplotipos de referencia son consistentes con los posibles pares de haplotipos. En tales casos, el individuo es haplotipificado preferiblemente utilizando un método de haplotipificación molecular directa tal como, por ejemplo, la tecnología CLASPER System™ (Patente Estadounidense No. 5,866,404), o la PCR alelo-específica de largo alcance (Michalotos-Beloin et al., Nucl Acids Res 24:4841-4843, 1996).

También existe un método para determinar la frecuencia de un genotipo CNTF o haplotipo CNTF en una población. El método comprende determinar el genotipo o el par de haplotipos para el gen del CNTF que esté presente en cada miembro de la población, donde el genotipo o haplotipo comprende el par de nucleótidos o el nucleótido detectado en uno o más de los sitios polimórficos en el gen del CNTF, incluyendo pero no limitados al polimorfismo FS63 TER, y calcular la frecuencia con la que cualquier genotipo o haplotipo particular es hallado en la población. La población puede ser una población de referencia, una población de familia, una población del mismo sexo, un grupo de población, una población con característica específica (p.ej., un grupo de individuos que presenta una característica de interés, tal como una enfermedad médica o la respuesta a un tratamiento terapéutico).

Asimismo, los datos de frecuencia para genotipos y/o haplotipos CNTF hallados en una población de referencia son utilizados en un método destinado a identificar una asociación entre una característica y un genotipo CNTF o un haplotipo CNTF. La característica puede ser cualquier fenotipo detectable, incluyendo pero no limitado a la susceptibilidad de sufrir una patología o la respuesta a un tratamiento. El método incluye obtener datos relativos a la frecuencia del/de los genotipo(s) o haplotipo(s) de interés en una población de referencia así como en una población que presenta la característica. Los datos de frecuencia para una o ambas poblaciones, de referencia y de característica específica, pueden obtenerse genotipificando o haplotipificando cada individuo perteneciente a las poblaciones utilizando uno de los métodos anteriormente descritos. Los haplotipos para la población con característica específica pueden ser determinados directamente o, alternativamente, mediante el método predictivo genotipo/haplotipo anteriormente descrito.

Además de ello, los datos de frecuencia para las poblaciones de referencia y/o de característica específica son obtenidos accediendo a datos de frecuencia determinados con anterioridad, los cuales pueden estar en forma escrita o electrónica. Por ejemplo, los datos de frecuencia pueden estar presentes en una base de datos que sea accesible por ordenador. Una vez obtenidos los datos de frecuencia, se comparan las frecuencias del/de los genotipo(s) o haplotipo(s) de interés observadas en las poblaciones de referencia y de característica específica. Pueden compararse las frecuencias de todos los genotipos y/o haplotipos observados en las poblaciones. Si un genotipo o haplotipo particular para el gen del CNTF es más frecuente en la población de característica específica que en la población de referencia con una cantidad estadísticamente significativa, entonces se predice que la característica está asociada con este genotipo o haplotipo CNTF.

El análisis estadístico puede realizarse mediante el empleo de las pruebas estándares del análisis de la varianza (ANOVA) con una corrección de Bonferroni y/o un método bootstrap que simula muchas veces la correlación genotipo-fenotipo y calcula un valor de significancia. Cuando muchos polimorfismos están siendo analizados, puede realizarse una corrección al factor para corregir una asociación significativa que podría ser hallada por casualidad. Para los métodos estadísticos utilizables en los métodos de la presente invención, véase: Statistical Methods in Biology, 3ra edición, Bailey NTJ, Cambridge Univ. Press (1997); Introduction to Computational Biology, Waterman MS, CRC Press (2000), y Bioinformatics, Baxevanis AD y Ouellette BFF editores (2001) John Wiley & Sons, Inc.

La característica de interés puede ser una respuesta clínica que un paciente presenta a cualquier tratamiento terapéutico, por ejemplo, la respuesta a un fármaco destinado al CNTF o la respuesta a un tratamiento terapéutico a causa de una enfermedad médica.

Un genotipo o haplotipo detectable que está en desequilibrio de ligamiento con el genotipo o haplotipo CNTF de interés puede ser utilizado como marcador sustituto. Un genotipo que está en desequilibrio de ligamiento con un genotipo CNTF puede ser descubierto determinando si un genotipo o haplotipo particular para el gen del CNTF es más frecuente en la población que también presenta el genotipo marcador sustituto potencial que en la población de referencia con una cantidad estadísticamente significativa, entonces se predice que el genotipo marcador está asociado con este genotipo o haplotipo CNTF y entonces puede ser utilizado como marcador sustituto en lugar del genotipo CNTF.

Según se utiliza en el presente documento, "enfermedad médica" incluye pero no está limitada a cualquier enfermedad o patología manifestada a través de uno o más síntomas físicos y/o psicológicos para la cual es deseable un tratamiento, e incluye patologías y otros trastornos identificados con anterioridad o recientemente.

Según se utiliza en el presente documento, el término "respuesta clínica" significa alguno o todos de los siguientes casos: una medida cuantitativa de la respuesta, ninguna respuesta, y respuesta adversa (es decir, efectos secundarios).

Para poder deducir una correlación entre la respuesta clínica a un tratamiento y un genotipo o haplotipo CNTF, es necesario obtener datos sobre las respuestas clínicas presentadas por una población de individuos que recibieron el tratamiento, que en lo sucesivo se denominará la "población clínica". Estos datos clínicos pueden obtenerse analizando los resultados de un ensayo clínico que ya ha sido realizado y/o los datos clínicos pueden obtenerse diseñando y llevando a cabo uno o más ensayos clínicos nuevos.

Según se utiliza en el presente documento, el término "ensayo clínico" significa cualquier estudio de investigación diseñado para recopilar datos clínicos sobre las respuestas a un tratamiento particular, e incluye pero no está limitado a ensayos clínicos de la fase I, la fase II y la fase III. Se utilizan métodos estándares para definir la población de pacientes y para registrar a los sujetos.

Es preferido que los individuos incluidos en la población clínica hayan sido clasificados con respecto a la presencia de la enfermedad médica de interés. Esto es importante en aquellos casos en los que el/los síntoma(s) que está(n) siendo presentado(s) por los pacientes puede(n) ser causado(s) por más de una enfermedad subyacente, y en los que el tratamiento de las enfermedades subyacentes no son el mismo. Un ejemplo de ello sería un caso en el que los pacientes experimentan dificultades de respiración que son debidas a asma o a infecciones respiratorias. Si ambos grupos fuesen tratados con una medicación antiasmática, habría un grupo espurio de aparentes no respondedores que en realidad no tenían asma. Estas personas influirían en la capacidad para detectar alguna correlación entre el haplotipo y los resultados del tratamiento. Esta clasificación de pacientes potenciales podría emplear un examen físico estándar o una o más pruebas de laboratorio. Alternativamente, la clasificación de los pacientes podría emplear la haplotipificación para aquellas situaciones en las que hay una fuerte correlación entre el par de haplotipos y la susceptibilidad o gravedad de la enfermedad.

El tratamiento terapéutico de interés es administrado a cada individuo perteneciente a la población de ensayo y la respuesta de cada individuo al tratamiento es medida utilizando uno o más criterios predeterminados. Se considera que, en muchos casos, la población de ensayo presentará un espectro de respuestas y que el investigador elegirá el número de grupos de respuesta (p.ej., baja, media, alta) constituidos por la variedad de respuestas. Además de ello, el gen del CNTF para cada individuo perteneciente a la población de ensayo es genotipificado y/o haplotipificado, lo cual puede realizarse antes o después de administrar el tratamiento.

Después de que se hayan obtenido tanto los datos clínicos como los relativos a los polimorfismos, se establecerán las correlaciones entre la respuesta individual y el contenido de genotipo o haplotipo CNTF. Las correlaciones pueden establecerse de diferentes maneras. En un método, los individuos son agrupados de acuerdo con su genotipo o haplotipo (o par de haplotipos) CNTF (para lo cual también se utilizará el término grupo de polimorfismo), y a continuación se calculan los promedios y las desviaciones estándar de las respuestas clínicas presentadas por los miembros de cada grupo de polimorfismo.

A continuación, estos resultados son analizados para determinar si alguna variación observada en la respuesta clínica entre los grupos de polimorfismo es estadísticamente significativa. Algunos métodos de análisis estadístico que pueden utilizarse se describen en L.D. Fisher y G. vanBelle, "Biostatistics: A Methodology for the Health Sciences", Wiley-Interscience (New York) 1993. Este análisis puede incluir también un cálculo de regresión para determinar qué sitios polimórficos en el gen del CNTF otorgan la contribución más significativa a las diferencias relativas al fenotipo. Un modelo de regresión útil en el invento está descrito en la solicitud PCT titulada "Methods for Obtaining and Using Haplotype Data", presentada el 26 de junio de 2000.

Un segundo método para encontrar correlaciones entre el contenido de haplotipos CNTF y las respuestas clínicas utiliza modelos predictivos basados en algoritmos de optimización minimizadores de errores. Uno de los numerosos algoritmos de optimización posibles es un algoritmo genético (R. Judson, "Genetic Algorithms and Their Uses in Chemistry" en Reviews in Computational Chemistry, Vol. 10, págs. 1-73, K.B. Lipkowitz y D.B. Boyd, eds. (VCH Publishers, New York, 1997). El recocido simulado (Press et al., "Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing", Cambridge University Press (Cambridge) 1992, Cap. 10), (las) redes neuronales (E. Rich y K. Knight,

“Artificial Intelligence”, 2da edición (McGraw-Hill, New York, 1991, Cap. 18), los métodos estándar de descenso de gradiente (Press et al., supra Cap. 10), u otros métodos de optimización globales o locales (véase discusión en Judson, supra) también podrían utilizarse. Preferentemente, la correlación se encuentra utilizando un planteamiento de algoritmo genético tal como se describe en la solicitud PCT titulada “Methods for Obtaining and Using Haplotype Data”, presentada el 26 de junio de 2000.

Las correlaciones también pueden ser analizadas utilizando técnicas ANOVA para determinar qué cantidad de la variación observada en los datos clínicos es explicada por diferentes subgrupos de los sitios polimórficos en el gen del CNTF. Tal como se describe en la solicitud PCT titulada “Methods for Obtaining and Using Haplotype Data”, presentada el 26 de junio de 2000, el ANOVA es utilizado para probar hipótesis acerca de si una variable de respuesta es causada por, o está correlacionada con, una o más características o variables que puedan ser medidas (Fisher y vanBelle, supra, Cap. 10).

Partiendo de los análisis anteriormente descritos, el experto en la materia puede construir fácilmente un modelo matemático capaz de predecir la respuesta clínica en función del contenido de genotipos o haplotipos CNTF. Preferentemente, el modelo es validado en uno o más ensayos clínicos de seguimiento diseñados para verificar el modelo.

La identificación de una asociación entre una respuesta clínica y un genotipo o haplotipo (o par de haplotipos) para el gen del CNTF puede ser la base para diseñar un método diagnóstico destinado a determinar aquellos individuos que responderán o no responderán al tratamiento o, alternativamente, responderán a un nivel más bajo y por consiguiente pueden requerir más tratamiento, es decir, una dosis mayor de un fármaco. El método diagnóstico puede tener una de varias formas: por ejemplo, una prueba directa de ADN (es decir, genotipificar o haplotipificar uno o más de los sitios polimórficos en el gen del CNTF), una prueba serológica, o una medición relativa al examen físico. El único requisito es que exista una buena correlación entre los resultados de la prueba diagnóstica y el genotipo o haplotipo CNTF subyacente, que, a su vez, está en correlación con la respuesta clínica.

Un ordenador puede implementar alguna o todas las operaciones analíticas y matemáticas anteriormente discutidas. Además de ello, el ordenador puede ejecutar un programa que genera vistas (o pantallas) visualizadas en un dispositivo de visualización y con el que el usuario puede interactuar para mirar y analizar grandes cantidades de información relativa al gen del CNTF y su variación genómica, incluyendo la ubicación cromosómica, la estructura génica, y la familia génica, datos relativos a la expresión génica, datos relativos a polimorfismos, datos relativos a la secuencia genética, y datos clínicos datos relativos a la población (p.ej., datos sobre el origen etnogeográfico, respuestas clínicas, genotipos y haplotipos para una o más poblaciones). Los datos relativos a los polimorfismos CNTF descritos en el presente documento pueden ser almacenados como parte de una base de datos relacional (p.ej., una instancia de una base de datos Oracle o un grupo de archivos planos ASCII). Estos datos de polimorfismos pueden almacenarse en el disco duro del ordenador o pueden, por ejemplo, almacenarse en un CD-ROM o en uno o más dispositivos de almacenamiento accesibles por el ordenador. Por ejemplo, los datos pueden ser almacenados en una o más bases de datos que están en comunicación con el ordenador a través de una red.

Se proporcionan métodos, composiciones y kits para haplotipificar y/o genotipificar el gen del CNTF en un individuo. Los métodos incluyen identificar el nucleótido o el par de nucleótidos presente en el nucleótido: 103 G>A en GenBank número de acceso X55890 (Versión 1). Esta sustitución nucleotídica resulta en la creación de un sitio aceptor de empalme nuevo y una proteína aberrante resultante. Véase, PubMed ID # 9285965.

Las composiciones contienen cebadores y sondas oligonucleotídicos diseñados para hibridar específicamente con una o más regiones diana que contengan, o que estén adyacentes a, un sitio polimórfico. Los métodos y composiciones destinados a establecer el genotipo o haplotipo de un individuo en los sitios polimórficos novedosos descritos en el presente documento son útiles para poder estudiar el efecto de los polimorfismos en la etiología de enfermedades afectadas por la expresión y función de la proteína del CNTF o por su falta, estudiar la eficacia de fármacos destinados al CNTF, predecir la susceptibilidad individual a las enfermedades afectadas por la expresión y función de la proteína del CNTF y predecir la capacidad de respuesta individual a los fármacos destinados al CNTF.

Asimismo, se proporciona un método destinado a identificar una asociación entre un genotipo o haplotipo y una característica. La característica puede ser la susceptibilidad a sufrir una enfermedad, la gravedad de una enfermedad, la clasificación de los estadios de una enfermedad o la respuesta a un fármaco. Tales métodos son aplicables en el desarrollo de pruebas diagnósticas y tratamientos terapéuticos para todas las aplicaciones farmacogenéticas donde exista el potencial para una asociación entre un genotipo y los resultados de un tratamiento incluyendo mediciones de eficacia, mediciones farmacocinéticas (PK) y mediciones de efectos secundarios.

También se proporciona un sistema informático para almacenar y visualizar datos relativos a polimorfismos determinados para el gen del CNTF. El sistema informático comprende una unidad de proceso del ordenador; una pantalla; y una base de datos que contiene los datos relativos a los polimorfismos. Los datos relativos a los polimorfismos incluyen los polimorfismos, los genotipos y los haplotipos identificados para el gen del CNTF en una población de referencia. El sistema informático puede ser capaz de producir una visualización que muestra los haplotipos CNTF organizados de acuerdo con sus relaciones evolucionarias.

Se revelan sondas de SNP, las cuales son útiles en la clasificación de personas de acuerdo con sus tipos de variación genética. Las sondas de SNP de acuerdo con la invención son oligonucleótidos que pueden distinguir entre los alelos de un ácido nucleico SNP en ensayos convencionales de discriminación alélica.

5 Según se utiliza en el presente documento, un “ácido nucleico SNP” es una secuencia de ácido nucleico que comprende un nucleótido que es variable dentro de una secuencia nucleotídica por lo demás idéntica entre individuos o grupos de individuos, existiendo por consiguiente como alelos. Tales ácidos nucleicos SNP tienen preferiblemente una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 500 nucleótidos. Los ácidos nucleicos SNP pueden formar parte de un cromosoma, o pueden ser una copia exacta de una parte de un cromosoma, p.ej., mediante la amplificación de tal parte de un cromosoma a través de PCR o a través de clonación. Los ácidos nucleicos SNP se denominan en adelante simplemente “SNPs”. Las sondas de SNP de acuerdo con la invención son oligonucleótidos que son complementarios a un ácido nucleico SNP.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “complementario” significa exactamente complementario a lo largo de toda la longitud del oligonucleótido en el sentido de la palabra utilizado según Watson y Crick.

15 En ciertas realizaciones preferidas, los oligonucleótidos de acuerdo con este aspecto son complementarios a un alelo del ácido nucleico SNP, pero no a cualquier otro alelo del ácido nucleico SNP. Los oligonucleótidos de acuerdo con esta realización son capaces de discriminar entre los alelos del ácido nucleico SNP de varias maneras. Por ejemplo, bajo condiciones de hibridación estrictas, un oligonucleótido de longitud apropiada hibridará con un alelo del ácido nucleico SNP, pero no con cualquier otro alelo del ácido nucleico SNP. El oligonucleótido puede ser etiquetado por una etiqueta radiactiva o una etiqueta fluorescente. Alternativamente, un oligonucleótido de longitud apropiada puede ser utilizado como un cebador para la PCR, donde el nucleótido 3' terminal es complementario a un alelo del ácido nucleico SNP, pero no a cualquier otro alelo. En esta realización, la presencia o ausencia de amplificación mediante PCR determina el haplotipo del ácido nucleico SNP.

20 Por consiguiente, se revela un polinucleótido aislado que comprende una secuencia nucleotídica que es una variante polimórfica de una secuencia de referencia para el gen del CNTF o un fragmento del mismo. La secuencia de referencia comprende el No. de acceso X55890 (Versión 1) en GenBank y la variante polimórfica comprenden un polimorfismo, 103 G>A. La variante polimórfica es una isoforma (también denominada “isogen” en el presente documento) natural del gen del CNTF.

30 Al describir los sitios polimórficos identificados en el presente documento, se hace referencia a la cadena sentido del gen por razones de conveniencia. Sin embargo, como será reconocido por el experto en la materia, las moléculas de ácido nucleico que contienen el gen del CNTF pueden ser moléculas de cadena doble complementarias y, por consiguiente, una referencia hecha a un sitio particular en la cadena sentido se refiere también al sitio correspondiente en la cadena antisentido complementaria. De este modo, puede hacerse referencia al mismo sitio polimórfico en cualquiera de las dos cadenas y un oligonucleótido puede ser diseñado para hibridar específicamente con una u otra cadena en una región diana que contenga el sitio polimórfico. Por consiguiente, la invención incluye también polinucleótidos de cadena simple que son complementarios a la cadena sentido de las variantes genómicas del CNTF descritas en la presente memoria.

35 El/los efecto(s) de los polimorfismos sobre la expresión del CNTF puede(n) investigarse preparando células y/u organismos recombinantes, preferiblemente animales recombinantes que contienen una variante polimórfica del gen del CNTF. Tal como se utiliza en el presente documento, “expresión” incluye pero no está limitada a uno o más de los siguientes casos: transcripción del gen en ARNm precursor; corte y empalme y otros procesamientos del ARNm precursor para producir el ARNm maduro; estabilidad del ARNm; traducción del ARNm maduro a la proteína CNTF (incluyendo el uso de codones y la disponibilidad del ARNt); y la glicosilación y/u otras modificaciones del producto de translación, si se requieren para una expresión y función apropiadas.

40 Para preparar una célula recombinante, el isogen CNTF deseado puede ser introducido en el interior de la célula en un vector de tal manera que el isogen permanece extracromosómico. En tal situación, el gen será expresado por la célula desde la posición extracromosómica. El isogen CNTF puede ser introducido en una célula de tal manera que se recombina con el gen del CNTF endógeno presente en la célula. Tal recombinación requiere que tenga lugar un acontecimiento de recombinación doble, resultando de este modo en el polimorfismo deseado del gen del CNTF. Los vectores destinados a la introducción de genes tanto para la recombinación como para el mantenimiento extracromosómico son conocidos en la técnica, y puede utilizarse cualquier vector o construcción de vector apropiado. Métodos tales como la electroporación, el bombardeo de partículas, la coprecipitación con fosfato de calcio y la transducción viral para introducir ADN en el interior de las células son conocidos en la técnica; por este motivo, la elección del método podrá depender de la competencia y preferencia del profesional experto en la materia.

55 Los ejemplos de células en las que el isogen CNTF puede ser introducido incluyen, pero no están limitados a, células de cultivo continuo tales como COS, NIH/3T3, y células primarias o cultivadas del tipo de tejido relevante, es decir, ellas expresan el isogen CNTF. Tales células recombinantes pueden utilizarse para comparar las actividades biológicas de las distintas variantes proteínicas.

Los organismos recombinantes, es decir, animales recombinantes, que expresan un gen variante son preparados utilizando procedimientos estándar conocidos en la técnica. Una construcción que comprende el gen variante puede ser introducida en un animal no humano o un ancestro del animal en una fase embrionaria, es decir, en el estadio monocelular, o generalmente no posterior al estadio de ocho células. Animales transgénicos portadores de la construcción pueden hacerse mediante varios métodos conocidos por los expertos en la materia. Un método incluye transfectar en el embrión un retrovirus construido de tal manera que contiene uno o más elementos aislantes, un gen o genes de interés, y otros componentes conocidos por los expertos en la materia para proporcionar un vector-lanzadera completo que alberga el/los gen(es) aislados como un transgen, véase p.ej. la Patente Estadounidense No. 5,610,053. Otro método incluye inyectar directamente un transgen en el embrión. Un tercer método incluye el uso de células madre embrionarias.

Los ejemplos de animales en las que el isogen CNTF puede ser introducido incluyen, pero no están limitados a, ratones, ratas, otros roedores, y primates no humanos (véase "The Introduction of Foreign Genes into Mice" y las referencias citadas que incluye, en: Recombinant DNA, Editores. J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski, y M. Zoller, W. H. Freeman and Company, Nueva York, páginas 254-272). Los animales transgénicos que expresan establemente un isogen CNTF humano y producen proteínas CNTF humanas pueden utilizarse como modelos biológicos para estudiar enfermedades relacionadas a la expresión y/o actividad anormales del CNTF, y para efectuar el cribado y ensayo de diferentes fármacos candidatos, compuestos y regímenes terapéuticos para reducir los síntomas o efectos de estas enfermedades.

El lector experto en la materia entenderá que la mayoría o la totalidad de los compuestos utilizados en el tratamiento son capaces de formar sales, y que es habitual el uso de las formas de sal de los productos farmacéuticos, a menudo porque son cristalizadas y purificadas con más facilidad que las bases libres. En todos los casos, el uso de los productos farmacéuticos anteriormente descritos en forma de sales es contemplado en la descripción hecha en el presente documento, y a menudo es preferido, y las sales farmacéuticamente aceptables de todos los compuestos están incluidas en las designaciones de los mismos.

Muchos de los compuestos utilizados en el tratamiento son aminas y, por consiguiente, reaccionan con cualquiera de un número de ácidos inorgánicos y orgánicos para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables. Puesto que algunas de las aminas libres de los compuestos de la presente invención son típicamente aceites a temperatura ambiente, es preferible convertir las aminas libres en sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables para facilitar su manejo y administración, puesto que estas últimas suelen ser sólidas a temperatura ambiente. Los ácidos comúnmente empleados para formar tales sales son ácidos inorgánicos tales como el ácido clorhídrico, el ácido bromhídrico, el ácido yodhídrico, el ácido sulfúrico, el ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos, tales como el ácido p-toluenosulfónico, el ácido metanosulfónico, el ácido oxálico, el ácido p-bromofenilsulfónico, el ácido carbónico, el ácido succínico, el ácido cítrico, el ácido benzoico, el ácido acético y similares.

Ejemplos de tales sales farmacéuticamente aceptables son sulfato, piro-sulfato, bisulfato, sulfito, bisulfito, fosfato, monohidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, metafosfato, pirofosfato, cloruro, bromuro, yoduro, acetato, propionato, decanoato, caprilato, acrilato, formiato, isobutirato, caproato, heptanoato, propiolato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, maleato, butino-1,4-dioato, hexino-1,6-dioato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, ftalato, sulfonato, xilenosulfonato, fenilacetato, fenilpropionato, fenilbutirato, citrato, lactato,  $\beta$ -hidroxibutirato, glicolato, tartrato, metanosulfonato, propanosulfonato, naftaleno-1-sulfonato, naftaleno-2-sulfonato, mandelato y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables preferidas son aquellas formadas con ácido clorhídrico, ácido oxálico o ácido fumárico.

#### Administración

Las dosificaciones de los fármacos deben, en el análisis final, ser fijadas por el médico encargado del caso, usando su conocimiento de los fármacos, las propiedades de los fármacos en combinación según lo determinado en los ensayos clínicos, y las características del paciente, incluyendo otras enfermedades distintas a aquella por la que el médico está tratando al paciente. Las orientaciones generales de las dosificaciones, y algunas dosificaciones preferidas, pueden ser y serán proporcionadas en la presente memoria, por ejemplo; loperidona: de 1 a 50 mg una vez al día y lo más preferido de 12 a 16 mg una vez al día; Olanzapina: de aproximadamente 0,25 a 50 mg, una vez/día; preferible, de 1 a 30 mg, una vez/día; y lo más preferiblemente 1 a 25 mg una vez/día; Clozapina: de aproximadamente 12,5 a 900 mg diarios; preferible, de aproximadamente 150 a 450 mg diarios; Risperidona: de aproximadamente 0,25 a 16 mg diarios; preferible de aproximadamente 2 a 8 mg diarios; Sertindola: de aproximadamente 0,0001 a 1,0 mg/kg diariamente; Quetiapina: de aproximadamente 1,0 a 40 mg/kg administrados una vez al día o en dosis divididas; Ziprasidona: de aproximadamente 5 a 500 mg diarios; preferible de aproximadamente 50 a 100 mg diarios; Haldol: de 0,5 a 40 mg una vez al día.

Todos los compuestos implicados son disponibles oralmente y normalmente son administrados oralmente, y así es preferida la administración oral de la combinación adyuvante. Pueden administrarse conjuntamente, en forma de dosificación única, o pueden administrarse separadamente. Sin embargo, la administración por vía oral no es la única vía o incluso la única vía preferida. La administración transdérmica, por ejemplo, puede ser muy deseable para pacientes olvidadizos o quisquillosos a la hora de tomar medicamentos por vía oral. En circunstancias particulares,

uno de los fármacos puede administrarse por una vía, como la vía oral, y los otros pueden administrarse por vía transdérmica, percutánea, intravenosa, intramuscular, intranasal o intrarectal. La vía de administración puede variarse de cualquier manera, estando limitada por las propiedades físicas de los fármacos y la conveniencia del paciente y de la persona que cuida de él.

## 5 Medición del estado transcripcional

Preferiblemente, la medición del estado transcripcional es realizada por hibridización con matrices de transcripción, las cuales se describen en la presente subsección. Otros métodos determinados de medición del estado transcripcional se describirán más adelante en esta misma subsección.

### Las matrices de transcripción en general

10 Las matrices de transcripción se producen hibridizando a una micromatriz polinucleótidos detectablemente etiquetados que representan los transcritos de ARNm presentes en una célula (p.ej., ADNc etiquetado fluorescentemente, sintetizado a partir del ARNm celular total). Una micromatriz es una superficie con una matriz ordenada de sitios de unión (p.ej., de hibridización) para los productos de muchos de los genes en el genoma de una célula u organismo, preferiblemente la mayoría o la casi totalidad de los genes. Las micromatrices pueden hacerse de diversas maneras, varias de las cuales se describirán más adelante. Independientemente de como sean producidas, las micromatrices comparten ciertas características: Las matrices son reproducibles, permitiendo que múltiples copias de una matriz dada puedan ser producidas y fácilmente comparadas unas con otras. Preferiblemente, las micromatrices son pequeñas, habitualmente más pequeñas que 5 cm<sup>2</sup>, y están hechas de materiales que son estables bajo condiciones de unión (p.ej. de hibridización de ácidos nucleicos). Un sitio de unión o conjunto único de sitios de unión dados en la micromatriz se unirá específicamente al producto de un gen único en la célula. Aunque pueda haber más de un sitio de unión física (en adelante "sitio") por ARNm específico, la discusión que sigue asumirá, para fines de mayor claridad, que existe un solo sitio. En una realización específica, se utilizan matrices posicionalmente direccionables que contienen ácidos nucleicos fijados de secuencia conocida en cada posición.

25 Se entenderá que cuando un ADNc complementario al ARN de una célula es hecho e hibridizado a una micromatriz bajo condiciones de hibridización apropiadas, el nivel de hibridización con el sitio de la matriz correspondiente a cualquier gen particular reflejará la prevalencia en la célula del ARNm transcrito a partir de este gen. Por ejemplo, cuando un ADNc detectablemente etiquetado (p.ej., con un fluoróforo) y complementario al ARNm celular total es hibridizado a una micromatriz, el sitio en la matriz correspondiente a un gen (es decir, capaz de unirse específicamente al producto del gen) que no esté transcrito en la célula tendrá poca o ninguna señal (p.ej. señal fluorescente), y un gen para el que el ARNm codificado sea prevalente tendrá una señal relativamente fuerte.

### Preparación de micromatrices

35 Las micromatrices son conocidas en la técnica y consisten en una superficie a la que sondas que corresponden en su secuencia a productos de genes (p.ej., ADNc, ARNm, ARNc, polipéptidos, y fragmentos de los mismos), pueden ser hibridizadas o unidas específicamente en una posición conocida. En una realización, la micromatriz es un array (es decir, una matriz) en el que cada posición representa un sitio de unión discreto para un producto codificado por un gen (p.ej., una proteína o ARN), y en el que están presentes sitios de unión para los productos de la mayoría o la casi totalidad de los genes en el genoma del organismo. El "sitio de unión" (en adelante, "sitio") es un ácido nucleico o análogo de ácido nucleico al que un ADNc cognado particular puede hibridar específicamente. El ácido nucleico o análogo del sitio de unión puede ser, p.ej., un oligómero sintético, un ADNc de secuencia completa, un ADNc de secuencia menor que la completa, o el fragmento de un gen.

40 A pesar de que la micromatriz puede contener sitios de unión para los productos de todos o casi todos los genes en el genoma del organismo diana, tal exhaustividad no se requiere necesariamente. Habitualmente, la micromatriz tendrá sitios de unión correspondientes al por lo menos 50% aproximadamente de los genes del genoma, a menudo al por lo menos 75% aproximadamente, más a menudo al por lo menos 85% aproximadamente, aún más a menudo más del 90% aproximadamente, y en el caso más frecuente al por lo menos 99% aproximadamente. Preferiblemente, la micromatriz tiene sitios de unión para los genes relevantes para ensayar y confirmar un modelo de red biológica de interés.

50 Un "gen" es identificado como un marco abierto de lectura (ORF) de preferiblemente al menos 50, 75, ó 99 aminoácidos a partir de los cuales un ARN mensajero es transcrito en el organismo (p.ej., tratándose de una célula única) o en alguna célula de un organismo multicelular. El número de genes de un genoma puede estimarse partiendo del número de ARNm expresados por el organismo, o mediante la extrapolación de una parte bien caracterizada del genoma. Cuando el genoma del organismo de interés ha sido secuenciado, puede determinarse el número de ORFs e identificarse las regiones codificantes del ARNm mediante el análisis de la secuencia del ADN. Por ejemplo, el genoma *Saccharomyces cerevisiae* ha sido secuenciado completamente y se reporta que tiene 55 aproximadamente 6275 marcos abiertos de lectura (ORFs) con una longitud de más de 99 aminoácidos. El análisis de estos ORFs indica que hay 5885 ORFs que probablemente especifican productos proteicos (Goffeau et al., 1996,

Life with 6000 genes, *Science* 274:546-567, que se incorpora por referencia en su totalidad a todos los efectos). Se estima que, a diferencia de ello, el genoma humano contiene aproximadamente 100.000 genes.

#### Preparar ácidos nucleicos para micromatrices

5 Como se ha indicado anteriormente, el "sitio de unión" con el que un ADNc cognado particular hibridiza específicamente es por lo general un ácido nucleico o un análogo de ácido nucleico fijado en este sitio de unión. Los sitios de unión de la micromatriz pueden ser polinucleótidos de ADN correspondientes a por lo menos una parte de cada gen en el genoma de un organismo. Estos ADN pueden obtenerse mediante, p.ej., amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de segmentos de genes de ADN genómico, ADNc (p.ej., por RT-PCR), o secuencias clonadas. Los cebadores de PCR son elegidos basándose en la secuencia conocida de los genes o ADNc, que resultan en la amplificación de fragmentos únicos (es decir, fragmentos que no comparten más de 10 bases de secuencia idéntica contigua con cualquier otro fragmento en la micromatriz). Los programas de ordenador son útiles en el diseño de cebadores con la especificidad requerida y propiedades de amplificación óptimas. Véase, p.ej., Oligo pl versión 5.0 (National Biosciences). En el caso de sitios de unión correspondientes a genes muy largos, será a veces deseable amplificar segmentos cerca del extremo 3' del gen de tal manera que cuando sondas de ADNc sometidas a cebado por oligo-dT hibridan a la micromatriz; las sondas de secuencia menor que la completa se unirán eficientemente. Típicamente, cada fragmento de un gen sobre la micromatriz tendrá una longitud de entre aproximadamente 50 pb y aproximadamente 2000 pb, más típicamente de entre aproximadamente 100 pb y aproximadamente 1000 pb, y generalmente de entre aproximadamente 300 pb y aproximadamente 800 pb. Los métodos de PCR son bien conocidos y se describen, por ejemplo, en Innis et al. eds., 1990, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press Inc. San Diego, California, que se incorpora por referencia en su totalidad a todos los efectos. Será evidente que los sistemas robóticos controlados por ordenador son útiles para aislar y amplificar ácidos nucleicos.

25 Un medio alternativo para generar el ácido nucleico para la micromatriz es mediante la síntesis de polinucleótidos u oligonucleótidos sintéticos, p.ej., utilizando N-fosfonato o fosforamidito como sustancias químicas (Froehler et al., 1986, *Nucleic Acid Res* 14:5399-5407; McBride et al., 1983, *Tetrahedron Lett.* 24:245-248). Las secuencias sintéticas tienen una longitud de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 500 bases, más típicamente de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 50 bases. Los ácidos nucleicos sintéticos pueden incluir bases no naturales, p.ej., la inosina. Como se ha indicado anteriormente, los análogos de ácido nucleico pueden ser utilizados como sitios de unión para la hibridización. Un ejemplo de un análogo de ácido nucleico apropiado es el ácido peptidonucleico (véase, p.ej., Egholm et al., 1993, PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules, *Nature* 365:566-568; véase también la Patente Estadounidense No. 5,539,083).

35 Alternativamente, los sitios de unión (hibridización) se hacen a partir de clones plasmídicos o fágicos de genes, ADNc (p.ej., marcadores de secuencia expresada), o insertos de los mismos (Nguyen et al., 1995, *Differential gene expression in the murine thymus assayed by quantitative hybridization of arrayed cDNA clones*, *Genomics* 29:207-209). Alternativamente, el polinucleótido de los sitios de unión es ARN.

#### Fijar ácidos nucleicos a la superficie sólida

40 El ácido nucleico o análogo son fijados a un soporte sólido, el cual puede estar hecho de vidrio, plástico (p.ej., polipropileno, nilón), poliacrilamida, nitrocelulosa, u otros materiales. Un método para fijar los ácidos nucleicos a una superficie es la impresión sobre placas de vidrio, según es descrito generalmente por Schena et al., 1995, *Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray*, *Science* 270:467-470. Este método es especialmente útil para preparar micromatrices de ADNc. Véase también DeRisi et al., 1996, *Use of a cDNA microarray to analyze gene expression patterns in human cancer*, *Nature Genetics* 14:457-460; Shalon et al., 1996, *A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization*, *Genome Res.* 6:639-645; y Schena et al., 1995, *Parallel human genome analysis; microarray-based expression of 1000 genes*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:10539-11286.

50 Un segundo método para producir micromatrices es haciendo matrices de oligonucleótidos de alta densidad. Se conocen técnicas para producir matrices que contienen miles de oligonucleótidos complementarios a secuencias definidas, en lugares definidos sobre una superficie empleando técnicas fotolitográficas para la síntesis in situ (véase, Fodor et al., 1991, *Light-directed spatially addressable parallel chemical synthesis*, *Science* 251:767-773; Pease et al., 1994, *Light-directed oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5022-5026; Lockhart et al., 1996, *Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays*, *Nature Biotech* 14:1675; las Patentes Estadounidenses Nos. 5,578,832; 5,556,752; y 5,510,270) u otros métodos para la síntesis y deposición rápidas de oligonucleótidos definidos (Blanchard et al., 1996, *High-Density Oligonucleotide arrays*, *Biosensors & Bioelectronics* 11: 687-90). Cuando se utilizan estos métodos, los oligonucleótidos (p.ej., 20-meros) de secuencia conocida son sintetizados directamente sobre una superficie tal como una placa de vidrio derivatizado. Por lo general, la matriz producida es redundante, con varias moléculas oligonucleotídicas por ARN. Las sondas oligonucleotídicas pueden ser elegidas para detectar ARNm alternativamente empalmados.

También pueden emplearse otros métodos para producir micromatrices, p.ej., mediante enmascaramiento (Maskos y Southern, 1992, Nuc. Acids Res. 20:1679-1684). En principio, podría utilizarse cualquier tipo de matriz, por ejemplo, dot blots sobre una membrana de hibridación de nilón (véase Sambrook et al., Molecular Cloning—A Laboratory Manual (2da Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989, que se incorpora en su totalidad a todos los efectos), aunque, como será reconocido por los expertos en la materia, se preferirán matrices muy pequeñas porque los volúmenes de hibridación serán menores.

#### Generar sondas etiquetadas

Los Métodos para preparar ARN total y poli (A)+ son bien conocidos y están descritos generalmente en Sambrook et al., supra. El ARN es extraído de los varios tipos de células que son de interés en esta invención utilizando la lisis con tiocianato de guanidina seguida de centrifugación en CsCl (Chirgwin et al., 1979, Biochemistry 18:5294-5299). El ARN poli (A)+ es seleccionado mediante selección con celulosa oligo-dT (véase Sambrook et al., supra). Las células de interés incluyen células de tipo salvaje, células de tipo salvaje expuestas a fármacos, células con constituyente(s) celular(es) modificado(s)/perturbado(s), y células expuestas a fármacos con constituyente(s) celular(es) modificado(s)/perturbado(s).

El ADNc etiquetado es preparado a partir de ARNm mediante transcripción inversa con cebado por oligo-dT o cebado aleatorio, siendo ambos bien conocidos en la técnica (véase p.ej., Klug y Berger, 1987, Methods Enzymol. 152:316-325). La transcripción inversa puede llevarse a cabo en presencia de un dNTP conjugado a una etiqueta detectable, lo más preferentemente un dNTP etiquetado fluorescentemente. Alternativamente, un ARNm aislado puede ser convertido en ARN antisentido etiquetado sintetizado mediante transcripción in vitro de ADNc de cadena doble en presencia de dNTP etiquetados (Lockhart et al., 1996, Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays, Nature Biotech. 14:1675, que se incorpora por referencia en su totalidad a todos los efectos). Alternativamente, la sonda de ADNc o ARN puede ser sintetizada en ausencia de una etiqueta detectable y puede etiquetarse posteriormente, p.ej., mediante la incorporación de dNTP o rNTP biotinilados, o algún medio similar (p.ej., fotoentrecruzamiento de un derivado de psoraleno de la biotina a ARN), seguido de la añadidura de estreptavidina etiquetada (p.ej., estreptavidina conjugada con ficoeritrina) o el equivalente.

Cuando se utilizan sondas etiquetadas fluorescentemente, son conocidos muchos fluoróforos apropiados, incluyendo la fluoresceína, lisamina, ficoeritrina, rodamina (Perkin Elmer Cetus), Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, FluorX (Amersham) y otros (véase, p.ej., Kricka, 1992, Nonisotopic DNA Probe Techniques, Academic Press San Diego, California). Se entenderá que se elegirán pares de fluoróforos que tengan espectros de emisión distintos de manera que puedan distinguirse con facilidad.

Alternativamente, se utiliza una etiqueta distinta de una etiqueta fluorescente. Por ejemplo, pueden utilizarse una etiqueta radiactiva, o un par de etiquetas radiactivas con espectros de emisión distintos (véase Zhao et al., 1995, High density cDNA filter analysis: a novel approach for large-scale, quantitative analysis of gene expression, Gene 156:207; Pietu et al., 1996, Novel gene transcripts preferentially expressed in human muscles revealed by quantitative hybridization of a high density cDNA array, Genome Res. 6:492). Sin embargo, debido a la dispersión de partículas radiactivas, y la consiguiente necesidad de sitios de unión separados por espacios amplios, el uso de radioisótopos es una realización menos preferida.

El ADNc etiquetado es sintetizado incubando una mezcla que contiene 0,5 mM de dGTP, dATP y dCTP más 0,1 mM de dTTP más desoxirribonucleótidos fluorescentes (p.ej., 0,1 mM de UTP marcado con rodamina 110 (Perkin Elmer Cetus) ó 0,1 mM de dUTP marcado con Cy3 (Amersham)) con transcriptasa inversa (p.ej., SuperScript™ II, LTI Inc.) a 42°C durante 60 min.

#### Hibridación con micromatrices

Las condiciones de hibridación y lavado de los ácidos nucleicos son elegidas de tal manera que la sonda "se une específicamente" o "hibrida específicamente" con un sitio específico de la matriz, es decir, la sonda hibrida, se aparea o se une a un sitio secuencial de la matriz con una secuencia de ácido nucleico complementaria, pero no hibrida con un sitio con una secuencia de ácido nucleico no complementaria. Tal como se utiliza en el presente documento, una secuencia polinucleotídica es considerada complementaria a otra cuando, si el más corto de los polinucleótidos es inferior o igual a 25 bases, no hay desapareamientos utilizando reglas estándar de apareamiento de bases o, si el más corto de los polinucleótidos es más largo que 25 bases, no existe más que un desapareamiento del 5%. Preferentemente, los polinucleótidos son perfectamente complementarios (ningún desapareamiento). Puede demostrarse fácilmente que unas condiciones de hibridación específicas resultan en una hibridación específica mediante la realización de un ensayo de hibridación incluyendo controles negativos (véase, p.ej., Shalon et al., supra, y Chee et al., supra).

Unas condiciones de hibridación óptimas dependerán de la longitud (p.ej., oligómero frente a polinucleótido más grande que 200 bases) y del tipo (p.ej., ARN, ADN, APN) de sonda etiquetada y de polinucleótido u oligonucleótido inmovilizados. Los parámetros generales para condiciones de hibridación específicas (es decir, estrictas) para ácidos nucleicos son descritos en Sambrook et al., supra, y en Ausubel et al., 1987, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, que se incorpora en su totalidad a todos los efectos.

5 Cuando se utilizan las micromatrices de ADNc de Schena et al, las condiciones de hibridación típicas son la hibridación en SSC 5X más 0,2% SDS a 65°C durante 4 horas seguida de lavados a 25°C en tampón de lavado de baja astringencia (SSC 1X más 0,2% SDS) seguidos de 10 minutos a 25°C en tampón de lavado de alta astringencia (SSC 0,1X más 0,2% SDS) (Shena et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:10614). Unas condiciones de hibridación útiles también se proporcionan en, p.ej., Tijessen, 1993, Hybridization With Nucleic Acid Probes, Elsevier Science Publishers B. V. y Kricka, 1992, Nonisotopic DNA Probe Techniques, Academic Press San Diego, California.

#### Detección de señales y análisis de datos

10 Cuando se utilizan sondas etiquetadas fluorescentemente, las emisiones de fluorescencia en cada sitio de una matriz de transcripción pueden ser detectadas, preferentemente, mediante microscopia de barrido láser confocal. Un barrido separado, con utilización de la línea de excitación apropiada, es llevado a cabo para cada uno de los dos fluoróforos utilizados. Alternativamente, puede utilizarse un láser que permite la iluminación de muestras a longitudes de ondas específicas de los fluoróforos utilizados y pueden analizarse las emisiones provenientes del fluoróforo. Las matrices son escaneadas con un escáner láser fluorescente con una mesa X-Y controlada por ordenador y un objetivo de microscopio. La excitación secuencial del fluoróforo es conseguida con un láser multilínea de gas mezclado y la luz emitida es dividida según la longitud de onda y detectada con un tubo fotomultiplicador. Los dispositivos de escaneo láser de fluorescencia son descritos en Schena et al., 1996, Genome Res. 6:639-645 y en otras referencias citadas en la presente memoria. Alternativamente, el haz de fibra óptica descrito por Ferguson et al., 1996, Nature Biotech. 14:1681-1684, puede utilizarse para monitorear los niveles de abundancia de ARNm en un gran número de sitios simultáneamente.

20 Las señales son registradas y analizadas por ordenador, p.ej., utilizando una tarjeta analógica-digital de 12 bits. En una realización, a la imagen escaneada se le elimina el moteado utilizando un programa de diseño gráfico (p.ej., Hijaak Graphics Suite) y a continuación es analizada utilizando un programa de cuadrículado de imágenes que crea una hoja de cálculo de la hibridación media a cada longitud de onda en cada sitio.

25 De ser necesario, puede hacerse una corrección determinada experimentalmente para interacciones de tipo "cross-talk" (o la superposición) entre los canales para los dos flúores. Es preferible calcular para cualquier sitio de hibridación particular sobre la matriz transcripcional una proporción de la emisión de los dos fluoróforos. La proporción es independiente del nivel de expresión absoluto del gen cognado, pero es útil para aquellos genes cuya expresión es modulada significativamente por la administración de fármacos, delección génica, o cualquier otra circunstancia ensayada.

30 Además de identificar una perturbación como positiva o negativa, es ventajoso determinar la magnitud de la perturbación. Ello puede llevarse a cabo por medio de métodos que serán fácilmente comprensibles para los expertos en la materia.

#### Otros métodos de medición del estado transcripcional

35 El estado transcripcional de una célula puede ser medido por otras tecnologías de expresión génica conocidas en la técnica.

#### Análisis de niveles de ARNm basado en el método TAQMAN™

40 El ensayo RT-PCR (PCR cuantitativa en tiempo real) utiliza una transcriptasa inversa de ARN para catalizar la síntesis de una hebra de ADN a partir de una hebra de ARN, incluyendo una hebra de ARNm. El ADN resultante puede detectarse y cuantificarse específicamente y este proceso se puede utilizar para determinar los niveles de especies específicas de ARNm. Un método para realizar ello es conocido bajo la marca registrada TAQMAN (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) y aprovecha la actividad nucleasa 5' de AMPLI TAQ GOLD™ ADN polimerasa para dividir una forma específica de sonda durante una reacción PCR. Ello es denominado sonda TAQMAN™. Véase, Luthra R, et al., Novel 5' exonuclease-based real-time PCR assay for the detection of t(14;18)(q32;q21) in patients with follicular lymphoma., Am J Pathol., Vol 153, (1998), págs.: 63-68. La sonda consiste en un oligonucleótido (por lo general ≈20-mero) con un colorante reportero en 5' y un colorante quencher en 3'. El colorante reportero fluorescente, como por ejemplo FAM (6-carboxifluoresceína), está enlazado covalentemente con el extremo 5' del oligonucleótido. El reportero es extinguido por TAMRA (6-carboxi-N,N,N',N'-tetrametilrodamina), fijado a través de un brazo de enlace que está localizado en el extremo 3'. Véase, Kuimelis RG, et al., Structural analogues of TaqMan probes for real-time quantitative PCR., Nucleic Acids Symp Ser., Vol 37, (1997), págs.: 255-256 y Mullah B, et al., Efficient synthesis of double dye-labeled oligodeoxyribonucleotide probes and their application in a real time PCR assay., Nucleic Acids Res., Vol 15, (1998), págs.: 1026-1031. Durante la reacción, la división de la sonda separa el colorante reportero y el colorante quencher, teniendo como resultado una fluorescencia incrementada del reportero.

55 La acumulación de productos de PCR es detectada directamente por monitorear el incremento de la fluorescencia del colorante reportero. Véase Held CA, et al., Real time quantitative PCR., Genome Res., Vol 6, (1996), págs.: 986-994. Las reacciones son caracterizadas más bien por aquel momento durante el ciclo en el que la amplificación de un producto de PCR es detectada por primera vez que por la cantidad del producto de PCR acumulada tras un número fijo de ciclos. Cuanto mayor sea el número inicial de copias del ácido nucleico diana, más pronto se

observará un incremento significativo de la fluorescencia. Véase, Gibson UE, et al., A novel method for real time quantitative RT-PCR, *Genome Res.*, Vol 6, (1996), págs.: 995-1001.

5 Cuando la sonda está intacta, la proximidad del colorante reportero al colorante quencher resulta en la supresión de la fluorescencia del reportero principalmente por transferencia de energía de tipo Förster. Véase, Lakowicz JR, et al., Oxygen quenching and fluorescence depolarization of tyrosine residues in proteins, *J Biol Chem.*, Vol 258, (1983), págs.: 4794-4801. Durante la PCR, si la diana de interés está presente, la sonda hibrida específicamente en la zona intermedia entre el cebador directo y el cebador inverso. La actividad nucleolítica 5'-3' de la AMPLITAQ GOLD™ ADN polimerasa divide la sonda entre el reportero y el quencher solamente si la sonda hibridiza con la diana. A continuación, los fragmentos de la sonda son desplazados de la diana, y la polimerización de la hebra continúa. Este proceso ocurre en cada ciclo y no interfiere con la acumulación exponencial del producto. El extremo 3' de la sonda es bloqueado para impedir la extensión de la sonda durante la PCR.

15 La referencia pasiva es un colorante incluido en el tampón TAQMAN™ y no participa en el ensayo nucleasa 5'. La referencia pasiva proporciona una referencia interna a la que la señal del colorante reportero puede ser normalizada durante el análisis de datos. La normalización es necesaria para corregir fluctuaciones fluorescentes debidas a cambios de concentración o de volumen.

La normalización se consigue dividiendo la intensidad de emisión del colorante reportero por la intensidad de emisión de la referencia pasiva para obtener una relación definida como el Rn (reportero normalizado) para un tubo de reacción dado.

20 El valor del ciclo umbral o Ct es el ciclo en el que un incremento estadísticamente significativo de  $\Delta Rn$  es detectado por primera vez. En un gráfico de Rn frente al número de ciclo, el ciclo umbral ocurre cuando la aplicación de detección de secuencia comienza a detectar el incremento en la señal asociado a un crecimiento exponencial del producto de PCR.

25 Para realizar mediciones cuantitativas se incluyen diluciones en serie de un ARNc (estándar) en cada experimento a fin de construir una curva estándar necesaria para la cuantificación exacta y rápida del ARNm. Para estimar la reproducibilidad de la técnica, la amplificación del mismo simple ARNc puede realizarse múltiples veces.

30 Otras tecnologías para medir el estado transcripcional de una célula producen pools de fragmentos de restricción de complejidad limitada para el análisis electroforético, tales como los métodos que combinan la doble digestión de enzimas de restricción con cebadores 'phasing' (véase, p.ej., la Patente Europea 0 534858 A1, presentada el 24 de septiembre de 1992, por Zabeau et al.), o métodos que seleccionan fragmentos de restricción con sitios más cercanos a un extremo de ARNm definido (véase, p.ej., Prashar et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:659-663).

Otros métodos realizan un muestreo estadístico de pools de ADNc, por ejemplo mediante la secuenciación de una cantidad suficiente de bases (p.ej., 20 a 50 bases) en cada uno de múltiples ADNc para identificar cada ADNc, o mediante la secuenciación de etiquetas cortas (p.ej., 9 a 10 bases) que son generadas en posiciones conocidas con relación a un extremo de ARNm definido (véase, p.ej., Velculescu, 1995, *Science* 270:484-487). patrón de vías.

35 medición de otros aspectos

Otros aspectos del estado biológico distintos al estado transcripcional, tal como el estado traduccional, el estado de actividad, o aspectos mixtos pueden medirse para obtener respuestas de fármacos y vías. Los detalles se describen en esta sección.

Mediciones del estado traduccional

40 La expresión de la proteína codificada por el/los gen(es) puede detectarse mediante una sonda que está etiquetada detectablemente, o que puede etiquetarse posteriormente. Por lo general, la sonda es un anticuerpo que reconoce la proteína expresada.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, el término anticuerpo incluye, pero no está limitado a, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados o quiméricos, y fragmentos de anticuerpo biológicamente funcionales suficientes para la unión del fragmento de anticuerpo a la proteína.

50 Para la producción de anticuerpos de una proteína codificada por uno de los genes revelados, pueden inmunizarse varios animales huéspedes mediante inyección con el polipéptido, o una parte del mismo. Tales animales huéspedes pueden incluir, pero no están limitados a, conejos, ratones y ratas, por nombrar solo algunos. Varios adyuvantes pueden utilizarse para incrementar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie huésped, incluyendo, pero no limitados a, adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como de hidróxido de aluminio, sustancias tensoactivas tales como la lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa californiana, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) y el *Corynebacterium parvum*.

Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas de los sueros de animales inmunizados con un antígeno, como por ejemplo un producto de gen diana, o un derivado funcional antigénico del mismo. Para la producción de anticuerpos policlonales, se pueden inmunizar animales hospedadores, tales como los que se han descrito anteriormente, mediante inyección con la proteína codificada, o una parte de la misma, suplementada con adyuvantes según también se han descrito anteriormente.

Los anticuerpos monoclonales (mAb), que son poblaciones homogéneas de anticuerpos contra un antígeno particular, pueden obtenerse por cualquier técnica que permita la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas continuas de células en cultivo. Éstas incluyen, pero no están limitadas a, la técnica del hibridoma presentada por Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-497 (1975); y Patente Estadounidense No. 4,376,110. La técnica del hibridoma de células B humanas de Kosbor et al., *Immunology Today*, 4:72 (1983); Cole et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:2026-2030 (1983); y la técnica de hibridoma EBV, Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96 (1985). Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulinas incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma que produce el mAb de esta invención puede cultivarse in vitro o in vivo. La producción de altos títulos de mAb in vivo hace que éste sea el método de producción actualmente preferido.

Además de ello, pueden emplearse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos", Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984); Neuberger et al., *Nature*, 312:604-608 (1984); Takeda et al., *Nature*, 314:452-454 (1985), mediante corte y empalme de los genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad antigénica apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humana de actividad biológica apropiada. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes son derivadas de especies animales diferentes, tales como aquellas que tienen una región variable o hipervariable derivada de un mAb murino y una región constante de inmunoglobulina humana.

Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla, Patente Estadounidense No. 4,946,778; Bird, *Science*, 242:423-426 (1988); Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883 (1988); y Ward et al., *Nature*, 334:544-546 (1989), pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena sencilla de genes expresados diferencialmente. Los anticuerpos de cadena sencilla son formados enlazando los fragmentos de cadena pesados y ligeros de la región Fv a través de un puente de aminoácido, resultando en un polipéptido de cadena sencilla.

Más preferentemente, pueden adaptarse técnicas útiles para la producción de "anticuerpos humanizados" para producir anticuerpos de las proteínas, fragmentos o derivados de las mismas. Tales técnicas son reveladas en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,932,448; 5,693,762; 5,693,761; 5,585,089; 5,530,101; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,661,016; y 5,770,429.

Los fragmentos de anticuerpos, que reconocen epitopos específicos, pueden generarse por medio de técnicas conocidas. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen, pero no están limitados a, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> que pueden producirse b digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos Fab que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Alternativamente, pueden construirse bibliotecas de expresión Fab, Huse et al., *Science*, 246:1275-1281 (1989), para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada.

A continuación, la medida en la que las proteínas conocidas están expresadas en la muestra es determinada mediante métodos de inmunoensayo que utilizan los anticuerpos descritos anteriormente. Tales métodos de inmunoensayo incluyen, pero no están limitados a, las técnicas Dot blot, Western blot, ensayos de unión competitiva y no competitiva a proteínas, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), la inmunohistoquímica, la citometría de flujo con separador celular activado por fluorescencia (FACS), y otros habitualmente utilizados y ampliamente descritos en la literatura científica y de patentes, y muchos de uso comercial.

Es particularmente preferido, para facilitar la detección, el ensayo ELISA sándwich, del que existen un número de variantes, todos los cuales deben ser abarcados por de la presente invención. Por ejemplo, en un típico ensayo realizado en sentido directo, un anticuerpo no etiquetado es inmovilizado sobre un sustrato sólido y la muestra a ensayar es puesta en contacto con la molécula ligada tras un período de incubación apropiado, durante un período de tiempo suficiente como para permitir la formación de un complejo anticuerpo-antígeno binario. A estas alturas, un segundo anticuerpo, etiquetado con una molécula reportera capaz de inducir una señal detectable, es posteriormente añadido e incubado, permitiendo que el tiempo sea suficiente para la formación de un complejo ternario de anticuerpo-antígeno-anticuerpo etiquetado. Cualquier material no reaccionado es eliminado mediante lavado, y la presencia del antígeno es determinada por la observación de una señal, o puede ser cuantificada mediante la comparación con una muestra de control que contiene cantidades conocidas de antígeno. Las variaciones del ensayo en sentido directo incluyen el ensayo simultáneo, en el que tanto la muestra como el anticuerpo son añadidos simultáneamente al anticuerpo ligado, o un ensayo en sentido inverso en el que el anticuerpo etiquetado y la muestra a ensayar son previamente combinados, incubados y añadidos al anticuerpo no etiquetado ligado a la superficie. Estas técnicas son muy conocidas por los expertos en la materia, y se entenderá fácilmente la posibilidad de variaciones menores. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "ensayo sándwich" pretende abarcar todas las variaciones de la técnica sándwich básica. Para los inmunoensayos de la

presente invención, el único factor limitante consiste en que el anticuerpo etiquetado tiene que ser un anticuerpo que sea específico para la proteína expresada por el gen de interés.

Las moléculas reporteras más utilizadas en este tipo de ensayo son o enzimas, o moléculas que contienen fluoróforos o moléculas que contienen radionúclidos. En el caso de un ensayo inmunoenzimático, una enzima es conjugada al segundo anticuerpo, generalmente por medio de glutaraldehído o peryodato. Sin embargo, y como será apreciado fácilmente, existe una gran variedad de técnicas de ligado diferentes, que son muy conocidas por los expertos en la materia. Las enzimas comúnmente utilizadas incluyen la peroxidasa de rábano picante, glucosa-oxidasa, beta-galactosidasa y fosfatasa alcalina, entre otras. Los sustratos a utilizar con las enzimas específicas son elegidos generalmente para la producción, tras hidrólisis por la enzima correspondiente, de un cambio de color detectable. Por ejemplo, el p-nitrofenilfosfato es idóneo para el uso con conjugados de fosfatasa alcalina; para los conjugados de peroxidasa, se utilizan por lo general 1,2-fenilendiamina o toluidina. También es posible emplear sustratos fluorogénicos, los cuales proporcionan un producto fluorescente, en vez de los sustratos cromogénicos mencionados anteriormente. A continuación, una solución que contiene el sustrato apropiado es añadida al complejo terciario. El sustrato reacciona con la enzima ligada al segundo anticuerpo, dando una señal visual cualitativa, que se puede cuantificar adicionalmente, por lo general espectrofotométricamente, para dar una evaluación de la cantidad de proteína que está presente en la muestra de suero.

Alternativamente, compuestos fluorescentes, tales como la fluoresceína y la rodamina, pueden acoplarse químicamente a anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Una vez activado por iluminación con luz de una longitud de onda particular, el anticuerpo etiquetado con fluorocromos absorbe la energía luminosa, induciendo un estado de excitabilidad en la molécula, seguido de la emisión de la luz con una longitud de onda característica más larga. La emisión aparece como un color característico visualmente detectable con un microscopio óptico. Tanto las técnicas de inmunofluorescencia como las de EIA están muy bien establecidas en la técnica y son particularmente preferidas para el presente método. Sin embargo, también pueden emplearse otras moléculas reporteras, tales como radioisótopos, moléculas quimioluminiscentes o bioluminiscentes. Será muy evidente para los expertos en la materia cómo se puede variar el procedimiento para que se adapte al uso requerido.

La medición del estado traduccional también puede realizarse de acuerdo con varios métodos adicionales. Por ejemplo, el monitoreo del genoma completo de proteínas (es decir, del "proteoma", Goffeau et al., supra) puede llevarse a cabo construyendo una micromatriz en la que los sitios de unión comprenden anticuerpos inmovilizados, preferentemente monoclonales, específicos de una pluralidad de especies proteicas codificadas por el genoma celular. Preferiblemente, hay anticuerpos presentes para una fracción sustancial de las proteínas codificadas, o al menos para aquellas proteínas que son relevantes para ensayar o confirmar un modelo de red biológica de interés. Los métodos para producir anticuerpos monoclonales son bien conocidos (véase, p.ej., Harlow y Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., que se incorpora en su totalidad a todos los efectos). Se producen anticuerpos monoclonales contra fragmentos peptídicos sintéticos diseñados sobre la base de la secuencia genómica de la célula. Con semejante matriz de anticuerpos, las proteínas de la célula son puestas en contacto con la matriz, y su unión es ensayada con ensayos conocidos en la técnica.

Alternativamente, las proteínas pueden ser separadas mediante sistemas de electroforesis en gel en dos dimensiones. La electroforesis en gel en dos dimensiones es bien conocida en la técnica y típicamente incluye la focalización isoeléctrica a lo largo de una primera dimensión seguida de electroforesis SDS-PAGE a lo largo de una segunda dimensión. Véase, p.ej., Hames et al., 1990, *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*, IRL Press, New York; Shevchenko et al., 1996, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 93:1440-1445; Saggiocco et al., 1996, *Yeast* 12:1519-1533; Lander, 1996, *Science* 274:536-539. Los electroferogramas resultantes pueden analizarse mediante numerosas técnicas, incluyendo técnicas de espectrometría de masas, análisis de Western blot y de inmunoblot utilizando anticuerpos policlonales y monoclonales, y la microsecuenciación del N-terminal. Utilizando estas técnicas es posible identificar una fracción sustancial de todas las proteínas producidas bajo condiciones fisiológicas dadas, incluyendo en células (p.ej., en levadura) expuestas a un fármaco, o en células modificadas, p.ej., por delección o sobreexpresión de un gen específico.

#### Otros aspectos del estado biológico

Las mediciones de actividad pueden realizarse mediante cualquier medio funcional, bioquímico o físico apropiado para la actividad particular que está siendo caracterizada. En los casos en los que la actividad incluye una transformación química, la proteína celular puede ponerse en contacto con los sustratos naturales, y puede medirse la tasa de transformación. En los casos en los que la actividad incluye la asociación en unidades multiméricas, por ejemplo la asociación de un complejo activado de unión a ADN con ADN, puede medirse la cantidad de proteína asociada o las consecuencias secundarias de la asociación, tales como las cantidades del ARNm transcrito. Asimismo, donde se conoce solamente una actividad funcional, por ejemplo, como en el control del ciclo celular, puede observarse el rendimiento de la función.

Alternativamente, los datos de respuesta pueden ser formados de aspectos mixtos del estado biológico de una célula. Los datos de respuesta pueden producirse a partir de, p.ej., los cambios de ciertas abundancias de ARNm, cambios en ciertas abundancias de proteínas, y cambios en ciertas actividades de proteínas.

### La detección de ácidos nucleicos y proteínas como marcadores

El nivel de ARNm correspondiente al marcador puede ser determinado tanto por formatos in situ como por formatos in vitro en una muestra biológica utilizando métodos conocidos en la técnica. Con el término "muestra biológica" se pretende incluir tejidos, células, fluidos biológicos y los aislados de los mismos, aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes dentro de un sujeto. Muchos métodos de detección de expresión utilizan ARN aislado. Para los métodos in vitro, cualquier técnica de aislamiento de ARN no selectiva contra el aislamiento de ARNm puede utilizarse para la purificación de ARN a partir de células (véase, p.ej., Ausubel, et al., Ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York (1987-1999). Adicionalmente, grandes números de muestras de tejido pueden ser procesadas fácilmente utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, el proceso de aislamiento de ARN en una sola etapa, de Chomczynski, Patente Estadounidense No. 4,843,155 (1989).

El ARNm aislado puede ser utilizado en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, pero no están limitados a, los análisis Southern o Northern, los análisis de reacción en cadena de la polimerasa y matrices de sondas. Un método diagnóstico para la detección de niveles de ARNm incluyen poner en contacto el ARNm aislado con una molécula de ácido nucleico (sonda) que puede hibridar con el ARNm codificado por el gen que está siendo detectado. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ADNc de secuencia completa, o una parte del mismo, tal como un oligonucleótido con una longitud de al menos 7, 15, 30, 50, 100, 250 ó 500 nucleótidos y suficiente para hibridar específicamente, bajo condiciones estrictas, con un ARNm o ADN genómico codificando un marcador. La hibridación de un ARNm con la sonda indica que el marcador en cuestión está siendo expresado.

En un formato, el ARNm es inmovilizado en una superficie sólida y puesto en contacto con una sonda, por ejemplo, sometiendo a electroforesis el ARNm aislado en un gel de agarosa y transfiriendo del ARNm desde el gel a una membrana, como por ejemplo nitrocelulosa. En un formato alternativo, la(s) sonda(s) son inmovilizadas en una superficie sólida y el ARNm es puesto en contacto con la(s) sonda(s), por ejemplo, en una matriz tipo Gene Chips de Affymetrix. Un experto en la materia puede adaptar con facilidad los métodos de detección de ARNm conocidos para utilizarlos en detectar el nivel de ARNm codificado por los marcadores de la presente invención.

Un método alternativo para determinar el nivel de ARNm correspondiente a un marcador en una muestra incluye el proceso de amplificación de ácidos nucleicos, p.ej., mediante RT-PCR (la realización experimental expuesta en Mullis, Patente Estadounidense No. 4,683,202 (1987); reacción en cadena de la ligasa, Barany, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:189-193 (1991); replicación de secuencia autosostenida, Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1874-1878 (1990); sistema de amplificación transcripcional, Kwoh et al., Proc. Natl. Ac. Sci. USA, 86:1173-1177 (1989); Q-Beta Replicasa, Lizardi et al., Bio/Technology, 6:1197 (1988); replicación en círculo rodante, Lizardi et al., Patente Estadounidense No. 5,854,033 (1988); o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos, seguido de la detección de las moléculas amplificadas utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de las moléculas de ácido nucleico si tales moléculas están presentes en números muy pequeños. Tal y como se utiliza en el presente documento, los cebadores de amplificación están definidos como un par de moléculas de ácido nucleico que son capaces de hibridar a las regiones 5' ó 3' de un gen (hebras positiva y negativa, respectivamente, o viceversa) y contienen una región corta entre una y otra. En general, los cebadores de amplificación tienen una longitud de entre aproximadamente 10 y 30 nucleótidos y flanquean una región de entre aproximadamente 50 y 200 nucleótidos de longitud. Bajo condiciones apropiadas y con reactivos apropiados, tales cebadores permiten la amplificación de una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica flanqueada por los cebadores.

Para los métodos in situ, el ARNm no necesita ser aislado de las células antes de la detección. En tales métodos, una muestra celular o de tejido es procesada utilizando métodos histológicos conocidos. A continuación, la muestra es inmovilizada sobre un soporte, típicamente una placa de vidrio, y a continuación puesta en contacto con una sonda que es capaz de hibridar con un ARNm que codifica el marcador.

Como una alternativa a hacer determinaciones basadas en el nivel de expresión absoluto del marcador, las determinaciones pueden basarse en el nivel de expresión normalizado del marcador. Los niveles de expresión son normalizados mediante la corrección del nivel de expresión absoluto de un marcador comparando su expresión con la expresión de un gen que no sea un marcador, p.ej., un gen doméstico que está expresado constitutivamente. Los genes idóneos para la normalización incluyen genes domésticos tales como el gen de actina, o genes específicos de células epiteliales. Esta normalización permite la comparación del nivel de expresión en una muestra, p.ej., la muestra de un paciente, con otra muestra, o entre muestras provenientes de fuentes diferentes.

Alternativamente, el nivel de expresión puede proporcionarse como un nivel de expresión relativo. Para determinar un nivel de expresión relativo de un marcador, el nivel de expresión del marcador es determinado para 10 ó más muestras de muestras biológicas normales frente a las patológicas, preferentemente 50 ó más muestras, antes de la determinación del nivel de expresión para la muestra en cuestión. El nivel de expresión medio de cada uno de los genes ensayados en el mayor número de muestras es determinada, y esto se utiliza como un nivel de expresión de referencia para el marcador. El nivel de expresión del marcador determinado para la muestra de ensayo (nivel de expresión absoluto) y luego dividido por el valor de expresión medio obtenido para este marcador. Ello proporciona un nivel de expresión relativo.

Preferentemente, las muestras utilizadas en la determinación del nivel de referencia serán de pacientes que no tengan el polimorfismo. La elección de la fuente de células depende de la utilización del nivel de expresión relativo. Utilizar la expresión hallada en tejidos normales como un indicador de expresión media ayuda a verificar si el marcador ensayado es específico (frente a células normales). Además, a medida que se acumulan más datos, el valor de expresión media puede ser revisado, proporcionando valores de expresión media mejorados basados en los datos acumulados.

#### Detección de polipéptidos

Alternativamente, un polipéptido correspondiente a un marcador es detectado. Un agente preferido para la detección de un polipéptido de la invención es un anticuerpo capaz de unirse a un polipéptido correspondiente a un marcador de la invención, preferentemente un anticuerpo con una etiqueta detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales, o más preferentemente, monoclonales. Puede utilizarse un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (p.ej., Fab o F(ab')<sub>2</sub>). El término "etiquetado", con respecto a la sonda o al anticuerpo, pretende abarcar el etiquetado directo de la sonda o del anticuerpo acoplado (es decir, uniendo físicamente) una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, al igual que el etiquetado indirecto de la sonda o del anticuerpo por reactividad con otro reactivo que está etiquetado directamente. Los ejemplos para el etiquetado indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario utilizando un anticuerpo secundario etiquetado fluorescentemente y el etiquetado terminal de una sonda de ADN con biotina de tal manera que puede detectarse con estreptavidina etiquetada fluorescentemente.

Pueden aislarse proteínas de pacientes con trastornos psicóticos utilizando técnicas que son bien conocidas por los expertos en la materia. Los métodos de aislamiento de proteínas empleados pueden, por ejemplo, ser tales como los descritos en Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1988).

Puede emplearse una variedad de formatos para determinar si una muestra contiene una proteína que se une a un anticuerpo determinado. Los ejemplos de tales formatos incluyen, pero no están limitados a, el ensayo inmunoenzimático (EIA); el radioinmunoensayo (RIA), el análisis de Western blot y el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Un experto en la materia puede adaptar con facilidad los métodos conocidos de detección de proteínas/anticuerpos para utilizarlos en determinar si ciertas células expresan un marcador de la presente invención.

En un formato, pueden utilizarse anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos, en métodos tales como las técnicas de Western blot o de inmunofluorescencia para detectar las proteínas expresadas. En tales usos, es generalmente preferible inmovilizar o bien el anticuerpo o las proteínas en un soporte sólido. Los soportes o portadores de fase sólida incluyen cualquier soporte capaz de unirse a un antígeno o a un anticuerpo. Los soportes o portadores bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nilón, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, gabros, y magnetita.

Un experto en la materia conocerá muchos otros portadores apropiados para unirse a un anticuerpo o a un antígeno, y será capaz de adaptar tal soporte para el uso con la presente invención. Por ejemplo, la proteína aislada de las células de pacientes puede ser sometida a electroforesis en gel de poliácridamida e inmovilizada sobre un soporte de fase sólida tal como nitrocelulosa. A continuación, el soporte puede ser lavado con tampones apropiados seguido de un tratamiento con un anticuerpo detectablemente etiquetado. A continuación, el soporte de fase sólida puede ser lavado con el tampón una segunda vez para eliminar el anticuerpo no unido. Posteriormente, la cantidad de etiqueta unida sobre el soporte sólido puede detectarse por medios convencionales.

Asimismo, se revelan kits para detectar la presencia de un polipéptido o ácido nucleico correspondiente a un marcador de la invención en una muestra biológica (p.ej., cualquier fluido corporal incluyendo pero no limitado a suero, plasma, linfa, fluido quístico, orina, heces, LCR, fluido ascítico, o sangre e incluyendo muestras de biopsia de tejidos corporales). Por ejemplo, el kit puede comprender un compuesto o agente etiquetado capaz de detectar un polipéptido o un ARNm codificador de un polipéptido correspondientes a un marcador de la invención en una muestra biológica y medios para determinar la cantidad del polipéptido o ARNm en la muestra (p.ej., un anticuerpo que se une al polipéptido o una sonda oligonucleotídica que se une a un ADN o ARNm que codifica el polipéptido). Los kits pueden incluir también instrucciones para interpretar los resultados obtenidos mediante la utilización del kit.

En caso de los kits basados en anticuerpos, el kit puede comprender, por ejemplo: 1) un primer anticuerpo (p.ej., fijado a un soporte sólido) que se une a un polipéptido correspondiente a un marcador de la invención; y, opcionalmente, 2) un segundo anticuerpo distinto que se une o bien al polipéptido o al primer anticuerpo y es conjugado a una etiqueta detectable.

En caso de los kits basados en oligonucleótidos, el kit puede comprender, por ejemplo: 1) un oligonucleótido, p.ej., un oligonucleótido detectablemente etiquetado, que hibridiza con una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido correspondiente a un marcador de la invención; o 2) un par de cebadores útiles para amplificar una molécula de ácido nucleico correspondiente a un marcador de la invención. El kit puede comprender también, p.ej., un agente tampón, un conservante, o un agente estabilizador de proteínas. El kit puede comprender, además,

componentes necesarios para detectar la etiqueta detectable (p.ej., una enzima o un sustrato). El kit puede contener también una muestra de control o una serie de muestras de control, que pueden ser ensayadas y comparadas con la muestra de ensayo. Cada componente del kit puede estar comprendido dentro de un recipiente individual y todos los varios recipientes pueden estar dentro de un solo paquete, junto con instrucciones para interpretar los resultados de los ensayos realizados utilizando el kit.

#### Introducción de anticuerpos al interior de células

La caracterización de proteínas intracelulares puede realizarse de varias maneras. Por ejemplo, pueden introducirse anticuerpos en el interior de las células de muchas maneras, incluyendo, por ejemplo, la microinyección de anticuerpos al interior de una célula (Morgan et al., 1988, *Immunology Today* 9:84-86) o transformando al interior de una célula un ARNm de hibridoma que codifica un anticuerpo deseado (Burke et al., 1984, *Cell* 36:847-858). En otra técnica adicional, anticuerpos recombinantes pueden ser ingenierizar y expresados ectópicamente en una gran variedad de tipos de células no linfoides para unirse a proteínas diana así como para bloquear las actividades de las proteínas diana (Biocca et al., 1995, *Trends in Cell Biology* 5:248-252). La expresión del anticuerpo está preferentemente bajo el control de un promotor controlable, tal como el promotor Tet, o un promotor constitutivamente activo (para la producción de perturbaciones de saturación). El primer paso es la selección de un anticuerpo monoclonal particular con una especificidad apropiada con respecto a la proteína diana (véase más adelante). A continuación, las secuencias que codifican las regiones variables del anticuerpo seleccionado pueden clonarse en varios formatos de anticuerpos ingenierizados, incluyendo, por ejemplo, un anticuerpo completo, fragmentos Fab, fragmentos Fv, fragmentos Fv de cadena sencilla (regiones VH y VL unidas por un ligador peptídico) (fragmentos "ScFv"), diacuerpos (dos fragmentos ScFv asociados con diferente especificidad, etcétera (Hayden et al., 1997, *Current Opinion in Immunology* 9:210-212). Los anticuerpos expresados intracelularmente de los diferentes formatos pueden direccionarse al interior de los compartimentos celulares (p.ej., el citoplasma, el núcleo, las mitocondrias, etc.) expresándolos como fusiones con la variedad de secuencias líder intracelulares conocidas (Bradbury et al., 1995, *Antibody Engineering* (vol. 2) (Borrebaeck ed.), págs. 295-361, IRL Press). En particular, el formato ScFv parece ser particularmente idóneo para el direccionamiento citoplasmático.

#### La variedad de tipos de anticuerpos útiles

Los tipos de anticuerpos incluyen, pero no están limitados a, policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena sencilla, fragmentos Fab, y una biblioteca de expresión Fab. Varios procedimientos conocidos en la técnica pueden utilizarse para la producción de anticuerpos policlonales de una proteína diana. Para la producción del anticuerpo, varios animales huéspedes puede ser inmunizados mediante la inyección con la proteína diana, tales animales huéspedes incluyen, pero no están limitados a, conejo, ratones, ratas, etc. Varios adyuvantes pueden utilizarse para incrementar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie huésped, e incluyen, pero no están limitados a, adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como de hidróxido de aluminio, sustancias tensoactivas tales como la lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como el bacilo de Calmette-Guérin (BCG) y el *Corynebacterium parvum*.

#### Anticuerpos monoclonales

Para la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos hacia una proteína diana, se puede utilizar cualquier técnica que permita la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas continuas de células en cultivo. Tales técnicas incluyen, pero no están restringidas a, la técnica del hibridoma originalmente desarrollada por Kohler y Milstein (1975, *Nature*, 256: 495-497), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas (Kosbor et al., 1983, *Immunology Today*, 4: 72), y la técnica de hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., 1985, en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96). Asimismo, pueden producirse anticuerpos monoclonales en animales libres de gérmenes utilizando tecnología reciente (PCT/US90/02545). Pueden usarse anticuerpos humanos y pueden obtenerse utilizando hibridomas humanos (Cole et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2026-2030), o transformando células B humanas con virus EBV in vitro (Cole et al., 1985, en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96). De hecho, de acuerdo con la invención, pueden usarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855; Neuberger et al., 1984, *Nature* 312:604-608; Takeda et al., 1985, *Nature* 314:452-454) mediante corte y empalme de los genes de una molécula de anticuerpo de ratón específica con respecto a la proteína diana junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada.

Adicionalmente, en los casos donde los anticuerpos monoclonales son ventajosos, éstos pueden seleccionarse alternativamente a partir de grandes bibliotecas de anticuerpos utilizando las técnicas de expresión en fagos (Marks et al., 1992, *J. Biol. Chem.* 267:16007-16010). Utilizando esta técnica se han expresado bibliotecas de hasta 1012 anticuerpos diferentes en la superficie de fagos fd filamentosos, creando un sistema inmune de anticuerpos in vitro de tipo "single pot", disponible para la selección de anticuerpos monoclonales (Griffiths et al., 1994, *EMBO J.* 13:3245-3260). La selección de anticuerpos de tales bibliotecas puede realizarse mediante técnicas conocidas en la técnica, que incluyen poner en contacto el fago con una proteína diana inmovilizada, seleccionar y clonar el fago

unido a la diana, y subclonar las secuencias que codifican las regiones variables del anticuerpo en un vector apropiado que expresa un formato de anticuerpos deseado.

Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (Patente de Estados Unidos No. 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena sencilla específicos de la proteína diana. Una realización adicional de la invención utiliza las técnicas descritas para la construcción de bibliotecas de expresión Fab (Huse et al., 1989, Science 246: 1275-1281) para permitir la identificación rápida y sencilla de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada respecto a la proteína diana.

Los fragmentos de anticuerpos que contienen el idiotipo de la proteína diana pueden generarse mediante técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen, pero no están limitados a: el fragmento F(ab')<sub>2</sub> que puede producirse por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo; los fragmentos Fab' que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro del fragmento F(ab')<sub>2</sub>, los fragmentos Fab que pueden generarse tratando la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor, y fragmentos Fv.

En la producción de anticuerpos, el cribado con respecto al anticuerpo deseado puede conseguirse mediante técnicas conocidas en la técnica, p.ej., ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas). Para seleccionar anticuerpos específicos de la proteína diana, se puede ensayar hibridomas generados o una biblioteca de anticuerpos de expresión en fagos respecto a un anticuerpo que se une a la proteína diana.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1

Algunos aspectos de la presente invención se pueden demostrar mediante un ejemplo que muestra la manera en la cual la correlación entre el polimorfismo en el gen del CNTF y la respuesta a la medicación antipsicótica fue hallada por primera vez.

En un esfuerzo por identificar factores genéticos que podrían estar asociados con la respuesta al tratamiento con iloperidona, fue investigada la relación entre un polimorfismo en el gen del CNTF (factor neurotrófico ciliar) (localizado en 11q12.2, siendo el polimorfismo 103 G>A en la secuencia GenBank X55890 (Versión 1), véase PubMed: 9285965) y la respuesta clínica al antipsicótico iloperidona en un ensayo clínico. Este ensayo fue un estudio multicéntrico aleatorizado de doble ciego, controlado con placebo y risperidona, para evaluar la eficacia y seguridad de dos rangos de dosis no superpuestos de iloperidona (12 ó 16 mg/d y 20 ó 24 mg/d y risperidona (6 ó 8 mg/d) en comparación con placebo, administrados dos veces al día (b.i.d) durante 42 días a pacientes esquizofrénicos seguido de una fase de tratamiento a largo plazo con iloperidona administrada una vez al día (q.d) a dosis de 4, 8, 12, 16, ó 24 mg/d durante 46 semanas a pacientes con esquizofrenia.

Un análisis farmacogenético para polimorfismos en genes candidatos fue realizado en la Fase II del ensayo clínico. Se determinó si el polimorfismo del CNTF (factor neurotrófico ciliar) en 103 G>A (secuencia GenBank X55890 (Versión 1)) 103 G>A, (alteración proteínica expresada FS63 TER) estuvo asociado con cualquiera de los parámetros clínicos de eficacia estudiados en el transcurso del ensayo clínico y cambia específicamente en las escalas BPRSA, PANNS total, PANNS positiva, PANNS negativa y PANNS general.

Una asociación significativa se observó entre el polimorfismo en el gen del CNTF y la respuesta al tratamiento (escalas BPRSA y PANNS total) en el grupo de tratamiento con 12-16 mg de Iloperidona. Para una descripción de la escala PANNS véase Kay SR et al. 1987, Schizophrenia Bulletin 13;2:261-276. Los individuos de este grupo que son del tipo GG del gen del CNTF respondieron significativamente mejor que el tipo no-GG y la respuesta del tipo GG frente a placebo es altamente significativa (p<0,001). Estos resultados muestran que las medicaciones antipsicóticas, tales como la iloperidona, tienen mayor eficacia para el tratamiento de trastornos psicóticos, tales como la esquizofrenia, entre individuos del tipo GG del gen del CNTF. De este modo fue identificada una asociación significativa entre el polimorfismo 103 G>A del CNTF (secuencia GenBank X55890 (Versión 1)) y tanto la escala BPRSA como la PANNS total.

Un total de 207 muestras de sangre únicas fueron recogidas de pacientes en los sitios de ensayo. El ADN fue extraído por Covance (Ginebra) utilizando el el kit de aislamiento de ADN PUREGENE™ (D-50K). El polimorfismo 103 G>A del CNTF (secuencia GenBank X55890 (Versión 1)) polimorfismo fue descrito por Takahashi, véase Takahashi et al. Nature Genet. 7: 79-84, 1994.

Los juegos de sondas para la genotipificación fueron diseñados y sintetizados por Third Wave Technologies, Inc (Madison, Wisconsin). La genotipificación fue realizada en 60 ng de ADN genómico utilizando el ensayo INVADER® de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Third Wave Technologies, Inc., Madison, Wisconsin), véase Ryan D et al. Molecular Diagnosis Vol. 4 No 2 1999:135-144 y Lyamichev V et al. Nature Biotechnology Vol 17 1999:292-296, véase también las Patentes de Estados Unidos 5,846,717 y 6,001,567 (cuyas revelaciones se incorporan en este documento por referencia en su totalidad).

El análisis implicó una prueba de análisis de la varianza durante los tratamientos para controlar si cualesquiera de los polimorfismos que fueron genotipificados estuvieron significativamente asociados con los parámetros clínicos. El

modelo consiste en el cambio porcentual en los parámetros clínicos categorizados por los genotipos. La asociación entre el genotipo y los parámetros clínicos, cuando los tratamientos son comparados con placebo, es establecida utilizando el análisis de la varianza y el análisis de la covarianza.

5 Los términos en el modelo del análisis de la varianza incluyen el cambio porcentual en los parámetros clínicos categorizados por el tratamiento para individuos con el mismo genotipo. Los términos en el modelo del análisis de la covarianza incluyen los valores de referencia y los valores de los criterios de valoración de los parámetros clínicos en estudio categorizados por grupos de tratamiento para individuos con el mismo genotipo. El análisis de la varianza durante los tratamientos desveló que la PANSS total y la BPRSA estuvieron significativamente asociadas ( $p < 0,001$ ) con el polimorfismo 103 G>A del CNTF en el CNTF para individuos tratados con una dosis de 12-16 mg de iloperidona (grupo A). El polimorfismo está presente en un intrón y resulta en la modificación de un sitio de corte y empalme, que a su vez resulta en un ARNm truncado. El resultado de estas modificaciones es una respuesta clínica variada.

### Ejemplo 2

15 Una mujer de 30 años de edad con una nueva aparición de un trastorno psicótico es vista por un médico. Después de diagnosticar un trastorno psicótico que podría ser influenciado positivamente con agentes antipsicóticos, su médico aconseja a la paciente sobre la posibilidad de hacerle una prueba para determinar la presencia del polimorfismo en el gen del CNTF y explica lo que este resultado significaría con respecto al uso de medicación, incluyendo la iloperidona.

20 Con el consentimiento de la paciente, el médico realiza una prueba para determinar el genotipo de la paciente y determina que la paciente tiene la forma GG del gen del CNTF en la posición 103. El médico discute con la paciente las consecuencias a corto y a largo plazo del tratamiento con medicación antipsicótica. El médico también discute las otras modalidades y medicaciones de tratamiento disponibles.

25 Basándose en estos resultados, el médico recomienda y la paciente acepta un ensayo de una medicación tal como la iloperidona para ayudar a controlar los síntomas del trastorno psicótico con la expectativa de que la paciente muestre una respuesta favorable a dosis relativamente bajas con efectos secundarios mínimos.

### Ejemplo 3

30 Un varón de 52 años de edad, con un trastorno psicótico es visto por su médico con molestias por efectos secundarios típicos de los antipsicóticos tales como la acatisia y las discinesias. El paciente está siendo tratado con iloperidona y sus síntomas psicóticos están bajo buen control pero está sufriendo numerosos efectos secundarios de la medicación. El médico recomienda la genotipificación y aconseja al paciente con respecto a las opciones de tratamiento que permitirían los resultados de la genotipificación. Se le hace una prueba al paciente y se determina que tiene el genotipo GG, asociado con la respuesta más favorable a la iloperidona. Basándose en este resultado y la alta sensibilidad esperada a la iloperidona, el médico es capaz de recomendar un régimen de tratamiento con una dosis sustancialmente más baja de iloperidona con una probabilidad reducida de efectos secundarios. El médico puede reducir la dosis de iloperidona del paciente y reducir los efectos secundarios y mejorar el cumplimiento del paciente sin arriesgar el empeoramiento del trastorno psicótico del paciente con un posible peligro para el paciente y otros.

### Glosario y definiciones

40 El siguiente glosario y las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar el entendimiento de ciertos términos utilizados frecuentemente en esta especificación.

Según se utiliza en el presente documento, el término “trastorno psicótico” significará cualquier situación psicológica patológica en la cual puedan ocurrir u ocurran síntomas psicóticos e incluye, pero no está limitada a lo siguiente; (véase también, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th Edition (DSM-IV) Francis A editor, American Psychiatric Press, Wash, D.C., 1994)

45 Trastornos esquizofrénicos

Esquizofrenia, catatónica, subcrónica, (295.21),

Esquizofrenia, catatónica, crónica, (295.22),

Esquizofrenia, catatónica, subcrónica con exacerbación aguda (295.23),

Esquizofrenia, catatónica, crónica con exacerbación aguda (295.24),

50 Esquizofrenia, catatónica, en remisión (295.55),

Esquizofrenia, catatónica, no especificada (295.20),

- Esquizofrenia, hebefrénica, subcrónica, (295.11),  
 Esquizofrenia, hebefrénica, crónica (295.12),  
 Esquizofrenia, hebefrénica, subcrónica con exacerbación aguda (295.13),  
 Esquizofrenia, hebefrénica, crónica con exacerbación aguda (295.14),  
 5 Esquizofrenia, hebefrénica, en remisión (295.15),  
 Esquizofrenia, hebefrénica, no especificada (295.10),  
 Esquizofrenia, paranoide, subcrónica, (295.31),  
 Esquizofrenia, paranoide, crónica, (295.32),  
 Esquizofrenia, paranoide, subcrónica con exacerbación aguda (295.33),  
 10 Esquizofrenia, paranoide, crónica con exacerbación aguda (295.34),  
 Esquizofrenia, paranoide, en remisión (295.35),  
 Esquizofrenia, paranoide, no especificada (295.30),  
 Esquizofrenia, no diferenciada, subcrónica (295.91),  
 Esquizofrenia, no diferenciada, crónica, (295.92),  
 15 Esquizofrenia, no diferenciada, subcrónica con exacerbación aguda (295.93),  
 Esquizofrenia, no diferenciada, crónica con exacerbación aguda (295.94),  
 Esquizofrenia, no diferenciada, en remisión (295.95),  
 Esquizofrenia, no diferenciada, no especificada (295.90),  
 Esquizofrenia, residual, subcrónica, (295.61),  
 20 Esquizofrenia, residual, crónica, (295.62),  
 Esquizofrenia, residual, subcrónica con exacerbación aguda (295.63),  
 Esquizofrenia, residual, crónica con exacerbación aguda (295.94),  
 Esquizofrenia, residual, en remisión (295.65),  
 Esquizofrenia, residual, no especificada (295.60),  
 25 Trastorno (paranoide) delirante (297.10),  
 Psicosis reactiva breve (298.80),  
 Trastorno esquizofreniforme (295.40),  
 Trastorno esquizoafectivo (295.70),  
 Trastorno psicótico inducido (297.30),  
 30 Trastorno psicótico NEOM (psicosis atípica) (298.90)  
 Trastornos afectivos  
 Trastorno depresivo mayor, grave con síntomas psicóticos (296.33),  
 Trastorno bipolar I, episodio maníaco único, grave con síntomas psicóticos (296.23),  
 Trastorno bipolar I, episodio más reciente hipomaníaco (296.43),  
 35 Trastorno bipolar I, episodio más reciente maníaco, grave con síntomas psicóticos (296.43),  
 Trastorno bipolar I, episodio más reciente mixto, grave con síntomas psicóticos (296.63)  
 Trastorno bipolar I, episodio más reciente depresivo, grave con síntomas psicóticos (296.53)

- Trastorno bipolar I, episodio más reciente no especificado (296.89)
- Trastorno bipolar II (296.89)
- Trastorno ciclotímico (301.13)
- Trastorno bipolar NEOM (366)
- 5 Trastorno del estado de ánimo debido a (patología médica general) (293.83)
- Trastornos del estado de ánimo NEOM (296.90)
- Trastorno del comportamiento, solitario de tipo agresivo (312.00)
- Trastorno del comportamiento, tipo no diferenciado (312.90)
- Trastorno de la Tourette (307.23),
- 10 Trastorno de tics motores o vocales crónicos (307.22),
- Trastorno de tics transitorios (307.21),
- Trastorno de tics NEOM (307.20),
- Trastornos por uso de sustancias psicoactivas
- Delirio por abstinencia de alcohol (291.00),
- 15 Alucinosis por alcohol (291.30),
- Demencia alcohólica asociada con el alcoholismo (291.20),
- Intoxicación por anfetamina o simpaticomiméticos de acción similar (305.70),
- Delirio por intoxicación por anfetamina o simpaticomiméticos de acción similar (292.81),
- Trastorno delirante por anfetamina o simpaticomiméticos de acción similar (292.11),
- 20 Trastorno delirante por Cannabis (292.11),
- Intoxicación por cocaína (305.60)
- Delirio por intoxicación por cocaína (292.81)
- Trastorno delirante por cocaína con ideas (292.11),
- Alucinosis por abuso de alucinógenos (305.30),
- 25 Trastorno delirante por alucinógenos (292.11),
- Trastorno del estado de ánimo por alucinógenos (292.84),
- Trastorno perceptivo persistente por alucinógenos (292.89),
- Intoxicación por fenciclidina (PCP) o arilciclohexilaminas de acción similar (305.90),
- Delirio por intoxicación por fenciclidina (PCP) o arilciclohexilaminas de acción similar (292.81),
- 30 Trastorno delirante por fenciclidina (PCP) o arilciclohexilaminas de acción similar (292.11),
- Trastorno del estado de ánimo por fenciclidina (PCP) o arilciclohexilaminas de acción similar (292.84),
- Trastorno mental orgánico por fenciclidina (PCP) o arilciclohexilaminas NEOM (292.90),
- Intoxicación por otras sustancias psicoactivas o no especificadas (305.90),
- Delirio inducido por otras sustancias psicoactivas o no especificadas (292.81),
- 35 Demencia por otras sustancias psicoactivas o no especificadas (292.82),
- Trastorno delirante por otras sustancias psicoactivas o no especificadas (292.11),
- Alucinosis por otras sustancias psicoactivas o no especificadas (292.12),

- Trastorno del estado de ánimo por otras sustancias psicoactivas o no especificadas (292.84),  
 Trastorno de ansiedad por otras sustancias psicoactivas o no especificadas (292.89),  
 Trastorno de personalidad por otras sustancias psicoactivas o no especificadas (292.89),  
 Trastorno mental orgánico por otras sustancias psicoactivas o no especificadas (292.90),
- 5 Delirio (293.00),  
 Demencia (294.10),  
 Trastorno obsesivo-compulsivo (300.30),  
 Trastorno explosivo intermitente (312.34),  
 Trastorno de control impulsivo NEOM (312.39)
- 10 Trastornos de personalidad  
 Trastorno de personalidad, paranoide (301.00),  
 Trastorno de personalidad, esquizoide (301.20),  
 Trastorno de personalidad, esquizotípico (301.22),  
 Trastorno de personalidad, antisocial (301.70),
- 15 Trastorno límite de la personalidad (301.83)
- El término “agente antipsicótico” según se utiliza en este documento significa cualquier medicación utilizada para reducir o mejorar los síntomas de psicosis en una persona con un trastorno psicótico e incluye, pero no está limitado a los siguientes compuestos: Maleato de acetofenacina; bromhidrato de alentemol; alpertina; azaperona; maleato de batelapina; benperidol; clorhidrato de bencindopirina; brofoxina; bromperidol; decanoato de bromperidol; clorhidrato de butaclamol; butaperazina; maleato de butaperazina; maleato de carfenazina; clorhidrato de carvedolol; clorhidrato de clorpromazina; clorhidrato de clorpromazina; clorprotixeno; cimpereno; cintramida; fosfato de clomacrana; clopenthixol; clopimozida; mesilato de clopipazana; clorhidrato de cloroperona; clotiapina; maleato de clotixamida; clozapina; clorhidrato de ciclofenazina; droperidol; clorhidrato de etazolol; fenimida; flucindol; flumezapina; decanoato de flufenazina; enantato de flufenazina; clorhidrato de flufenazina; fluspiperona; fluspirileno; flutrolina; clorhidrato de gevotrolina; halopemida; haloperidol; decanoato de haloperidol; iloperidol; clorhidrato de imidolina; lemperona; succinato de mazapertina; mesoridazina; besilato de mesoridazina; metiapina; milemperona; milipertina; clorhidrato de molindona; clorhidrato de naranol; clorhidrato de neflumozida; ocaperidona; olanzapina; oxiperomida; penfluridol; maleato de pentiapina; perfenazina; pimoza; clorhidrato de pinoxepina; pipamperona; piperacetazina; palmitato de pipotiazina; clorhidrato de piquindona; edisilato de proclorperazina; maleato de proclorperazina; clorhidrato de promazina; quetiapina; remoxiprida; clorhidrato de remoxiprida; risperidona; clorhidrato de rincazol; clorhidrato de seperidol; sertindol; setoperona; espiperona; tioridazina; clorhidrato de tioridazina; tiotixeno; clorhidrato de tiotixeno; clorhidrato de tioperidona; clorhidrato de tiospirona; clorhidrato de trifluoperazina; trifluperidol; triflupromazina; clorhidrato de triflupromazina; y clorhidrato de ziprasidona.
- Además, el término “agente antipsicótico” según se utiliza en este documento, incluye las llamadas medicaciones “antipsicóticas atípicas” incluyendo, pero no limitadas a:
- La olanzapina, 2-metil-4-(4-metil-1-piperazinil)-10H-tieno[2,3b][1,5]benzodiazepina, es un compuesto conocido y se describe en la Patente Estadounidense No. 5,229,382 como un fármaco útil para el tratamiento de la esquizofrenia, el trastorno esquizofreniforme, la manía aguda, los estados de ansiedad leves, y la psicosis. Patente Estadounidense No. 5,229,382;
- 40 La clozapina, 8-cloro-11-(4-metil-1-piperacínil)-5H-dibenzo[b,e][1,4]diazepina, se describe en la Patente Estadounidense No. 3,539,573. La eficacia clínica en el tratamiento de la esquizofrenia ya queda descrita (Hanes, et al., .Psychopharmacol. Bull., 24, 62 (1988));
- La risperidona, 3-[2-[4-(6-fluoro-1,2-benzisoxazol-3-il)piperidino]etil]-2-metil-6,7,8,9-tetrahidro-4H-pirido-[1,2-a]pirimidin-4-ona, y su uso en el tratamiento de enfermedades psicóticas se describen en la Patente Estadounidense No. 4,804,663;
- 45 El sertindol, 1-[2-[4-[5-cloro-1-(4-fluorofenil)-1H-indol-3-il]-1-piperidinil]etil]imidazolidin-2-ona, se describe en la Patente Estadounidense No. 4,710,500. Su uso en el tratamiento de la esquizofrenia se describe en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,112,838 y 5,238,945. Patentes Estadounidenses Nos. 4,710,500; 5,112,838; y 5,238,945;

La quetiapina, 5-[2-(4-dibenzo[b,f][1,4]tiazepin-11-il-1-piperazinil)etoxi]jetanol, y su actividad en ensayos que demuestran su utilidad en el tratamiento de la esquizofrenia se describen en la Patente Estadounidense No. 4,879,288, la quetiapina es típicamente administrada como su sal (E)-2-butendioato (2:1); y;

5 La ziprasidona, 5-[2-[4-(1,2-benzisotiazol-3-il)-1-piperazinil]etil]-6-cloro-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, es típicamente administrada como el clorhidrato monohidrato. El compuesto se describe en las Patentes Estadounidenses Nos. 4,831,031 y 5,312,925. Su actividad en ensayos que demuestran su utilidad en el tratamiento de la esquizofrenia se describen en la Patente Estadounidense No. 4,831,031. Patentes Estadounidenses Nos. 4,831,031 y 5,312,925.

10 “Nivel significativo” según se utiliza en este documento, en referencia al nivel de expresión de ARNm o producto polipeptídico de un alelo particular (por ejemplo el polimorfismo en el gen del CNTF (localizado en 11q12.2), siendo el polimorfismo 103 G>A en la secuencia GenBank X55890, véase PubMed: 9285965) significa aquel nivel de expresión que llevaría a un experto en la materia a creer que el alelo en cuestión estuvo presente.

“Anticuerpos” según se utiliza en este documento incluye los anticuerpos policlonales y monoclonales, los anticuerpos quiméricos, de cadena sencilla, y humanizados, al igual que los fragmentos Fab, incluyendo los productos de una biblioteca de expresión Fab o de otras inmunoglobulinas.

15 “Polinucleótido” se refiere generalmente a cualquier polirribonucleótido (ARN) o polidesoxirribonucleótido (ADN), que puede ser ARN o ADN no modificado o modificado. Los “polinucleótidos” incluyen, sin limitación, ADN mono y bicatenarios, el ADN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, los ARN mono y bicatenarios, y el ARN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, las moléculas híbridas comprendiendo ADN y ARN que pueden ser de cadena sencilla o, más típicamente, de cadena doble o una mezcla de regiones mono y bicatenarias.  
20 Además, “polinucleótido” se refiere a regiones tricatenarias comprendiendo ARN o ADN o tanto ARN como ADN. El término “polinucleótido” también incluye ADN o ARN que contienen una o más bases modificadas y ADN o ARN con esqueletos modificados por motivos de estabilidad o por otros motivos.

25 Las bases “modificadas” incluyen, por ejemplo, las bases tritiladas y las bases inusuales tales como la inosina. Se puede hacer una variedad de modificaciones al ADN y ARN; por tanto, “polinucleótido” abarca formas de polinucleótidos modificadas química, enzimática o metabólicamente tal como se encuentran típicamente en la naturaleza, al igual que las formas químicas de ADN y ARN características de los virus y las células. “Polinucleótido” también abarca polinucleótidos relativamente cortos, a menudo denominados oligonucleótidos.

30 “Polipéptido” se refiere a cualquier polipéptido que comprende dos o más aminoácidos juntados entre sí mediante enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isómeros peptídicos. “Polipéptido” se refiere tanto a cadenas cortas, comúnmente denominadas péptidos, oligopéptidos u oligómeros, como a cadenas más largas, generalmente denominadas proteínas. Los polipéptidos pueden contener otros aminoácidos que los 20 aminoácidos codificados por genes. Los “polipéptidos” incluyen secuencias de aminoácido modificadas o por procesos naturales, tales como el procesamiento postraduccion, o por técnicas de modificación química que son bien conocidas en el arte. Tales modificaciones son bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, al igual que en  
35 una literatura de investigación voluminosa. Pueden ocurrir modificaciones en cualquier lugar en un polipéptido, incluyendo el esqueleto peptídico, las cadenas laterales de los aminoácidos y los extremos aminoterminal o carboxiloterminal.

Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en grados iguales o variados en varios sitios en un polipéptido dado. Asimismo, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los  
40 polipéptidos pueden estar ramificados como resultado de la ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden resultar de procesos naturales de postraducción o pueden ser hechos por métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, biotilación, unión covalente de flavina, unión covalente de un grupo hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado nucleotídico, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, unión covalente de  
45 fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclas de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racernización, selenoilación, sulfación, adición de aminoácidos mediada por ARN de transferencia a proteínas tales como arginilación y ubiquitinación (véase, por ejemplo, Proteins  
50 - Structure and Molecular Properties, 2 nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993; Wold, F., Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, 1-12, en Post-translational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983; Seifter et al., “Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors”, Meth Enzymol, 182, 626-646, 1990, y Rattan et al., “Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging”, Ann NY Acad Sci, 663, 48-62, 1992).

55 “Fragmento” de una secuencia polipeptídica se refiere a una secuencia polipeptídica que es más corta que la secuencia de referencia pero que mantiene esencialmente la misma función o actividad biológica que el polipéptido de referencia.

- “Variante” se refiere a un polinucleótido o polipéptido que se diferencia de un polinucleótido o polipéptido de referencia, pero que conserva las propiedades esenciales del mismo. Una variante típica de un polinucleótido se diferencia en la secuencia nucleotídica del polinucleótido de referencia. Los cambios en la secuencia nucleotídica de la variante pueden o no alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificada por el polinucleótido de referencia. Los cambios nucleotídicos pueden resultar en sustituciones, adiciones, deleciones, fusiones y truncamientos de aminoácidos en el polipéptido codificado por la secuencia de referencia, como se discute más adelante. Una variante típica de un polipéptido se diferencia en la secuencia de aminoácido del polipéptido de referencia. Generalmente, las alteraciones están limitadas de modo que las secuencias del polipéptido de referencia y de la variante son en general estrechamente similares y, en muchas regiones, idénticas. Una variante y un polipéptido de referencia se pueden diferenciar en la secuencia de aminoácidos en una o más sustituciones, inserciones, deleciones en cualquier combinación. Un residuo de aminoácido sustituido o insertado puede o no ser codificado por el código genético. Las sustituciones conservativas típicas incluyen Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln-I Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe y Tyr. Una variante de un polinucleótido o polipéptido puede ser natural, como por ejemplo un alelo, o puede ser una variante de la que se desconoce un origen natural. Las variantes de polinucleótidos y polipéptidos no naturales pueden ser producidas por técnicas de mutagénesis o por síntesis directa. También se incluyen como variantes los polipéptidos que tienen una o más modificaciones postraduccionales, por ejemplo la glicosilación, fosforilación, metilación, ribosilación de ADP y similares. Las realizaciones incluyen la metilación del aminoácido N-terminal, las fosforilaciones de serinas y treoninas y las modificaciones de glicinas C-terminal.
- 20 “Polimorfismo” – La variación de secuencia observada en un individuo en un sitio polimórfico. Los polimorfismos incluyen sustituciones, inserciones, deleciones y microsátélites de nucleótidos y pueden, aunque no necesariamente, resultar en diferencias detectables en la expresión génica o la función proteica.
- “Sitio polimórfico (SP)” – Una posición dentro de un locus en la que al menos dos secuencias alternativas son halladas en una población, la más frecuente de las cuales tiene una frecuencia no superior al 99%.
- 25 “Variante polimórfica” – Un gen, ARNm, ADNc, polipéptido o péptido cuya secuencia de nucleótidos o aminoácidos se diferencia de una secuencia de referencia debido a la presencia de un polimorfismo en el gen.
- “Datos sobre polimorfismos” – Información acerca de uno o más de los siguientes puntos para un gen específico: localización de sitios polimórficos; variación de secuencia en estos sitios; frecuencia de polimorfismos en una o más poblaciones; los diferentes genotipos y/o haplotipos determinados para el gen; frecuencia de uno o más de estos genotipos y/o haplotipos en una o más poblaciones; cualquier asociación(es) conocida(s) entre una característica y un genotipo o un haplotipo para el gen.
- 30 “Base de datos de polimorfismos” – Una colección de datos de polimorfismos estructurados de forma sistemática o metódica y que pueden ser accedidos individualmente mediante medios electrónicos u otros medios.
- 35 “Polimorfismo de nucleótido simple” (SNP) se refiere a la presencia de una variabilidad nucleotídica en una posición nucleotídica simple en el genoma, dentro de una población. Un SNP puede presentarse dentro de un gen o dentro de regiones intergénicas del genoma. Los SNP se pueden ensayar utilizando la amplificación alelo-específica (ASA). Para el proceso se requieren al menos 3 cebadores. Un cebador común es utilizado como complemento reverso del polimorfismo que está siendo ensayado. Este cebador común puede ser de entre 50 y 1500 pb desde la base polimórfica. Los otros dos (o más) cebadores son idénticos el uno con el otro con la excepción de que la base del final 3’ tambalea para coincidir con uno de los dos (o más) alelos que constituyen el polimorfismo. A continuación, dos (o más) reacciones PCR son realizadas en muestras de ADN, utilizando cada una el cebador común y uno de los cebadores alelo-específicos.
- 40 “Variante de corte y empalme” según se utiliza en este documento se refiere a moléculas de ADNc producidas a partir de moléculas de ARN transcritas inicialmente a partir de la misma secuencia de ADN genómica, pero que han sido sometidas a corte y empalme alternativo de ARN. El corte y empalme alternativo de ARN ocurre cuando un transcrito primario de ARN es sometido al corte y empalme, generalmente para la eliminación de intrones, lo que resulta en la producción de más de una molécula de ARNm, cada una de las cuales puede codificar diferentes secuencias de aminoácidos. El término variante de corte y empalme también se refiere a las proteínas codificadas por las moléculas de ADNc arriba mencionadas.
- 45 La “identidad” refleja una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias polinucleotídicas, determinada mediante la comparación de las secuencias. En general, la identidad se refiere a una correspondencia exacta de nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido de las dos secuencias polinucleotídicas o las dos secuencias polipeptídicas, respectivamente, a lo largo de la longitud de las secuencias que están siendo comparadas.
- 50 “Homólogo” es un término genérico utilizado en la técnica para indicar una secuencia polinucleotídica o polipeptídica que posee un alto grado de parentesco secuencial con una secuencia de referencia. Tal parentesco puede ser cuantificado determinando el grado de identidad y/o similitud entre las dos secuencias según lo definido anteriormente en este documento. En este término genérico están comprendidos los términos “ortólogo” y

“parálogo”. “Ortólogo” se refiere a un polinucleótido o polipéptido que es el equivalente funcional del polinucleótido o polipéptido en otra especie. “Parálogo” se refiere a un polinucleótido o polipéptido que dentro de la misma especie que es funcionalmente similar.

5 “Proteína de fusión” se refiere a una proteína codificada por dos genes, no relacionados, fusionados o fragmentos de los mismos. Se han revelado ejemplos en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,541,087 y 5,726,044 (que ambas quedan incorporadas por referencia a todos los efectos). En el caso de Fc-PGPCR-3, emplear una región de inmunoglobulina Fc como parte de una proteína de fusión es ventajoso para realizar la expresión funcional de Fc-PGPCR-3 o fragmentos de Fc-PGPCR-3, para mejorar las propiedades farmacocinéticas de tal proteína de fusión cuando es utilizada para la terapia y para generar un Fc-PGPCR-3 dimérico. El constructo de ADN de Fc-PGPCR-3 comprende en la dirección 5’ a 3’, un cassette de secreción, es decir una secuencia señal que provoca la exportación a partir de una célula de mamífero, ADN que codifica un fragmento de la región de inmunoglobulina Fc, como pareja de fusión, y una Fc-PGPCR-3 o fragmentos de la misma, codificantes de ADN. En algunas utilizaciones sería deseable ser capaz de alterar las propiedades funcionales intrínsecas (unión de complemento, unión de receptores Fc) mutando los lados Fc funcionales dejando sin manipular el resto de la proteína de fusión o delecionar la parte Fc completamente después de la expresión.

15 “Alelo” – Una forma particular de un locus genético, distinguida de otras formas por su secuencia nucleotídica particular.

“Gen candidato” – Un gen del que se hipotetiza que es responsable de una enfermedad, patología, o la respuesta a un tratamiento, o que está correlacionado con una de éstas.

20 “Gen” – Un segmento de ADN que contiene toda la información para la biosíntesis regulada de un producto ARN, incluyendo promotores, exones, intrones, y otras regiones no traducidas que controlan la expresión.

“Genotipo” – Una secuencia 5’ a 3’ de par(es) nucleotídico(s) no fasada hallada en uno o más sitios polimórficos en un locus en un par de cromosomas homólogos en un individuo. Según se utiliza en este documento, el genotipo incluye un genotipo completo y/o un subgenotipo como descrito más adelante.

25 “Genotipo completo” – La secuencia 5’ a 3’ de pares nucleotídicos no fasada hallada en todos los sitios polimórficos conocidos en un locus en un par de cromosomas homólogos en un solo individuo.

“Subgenotipo” – La secuencia 5’ a 3’ de nucleótidos no fasada, vista en un subgrupo de los sitios polimórficos conocidos en un locus en un par de cromosomas homólogos en un solo individuo.

“Genotipificación” – Un proceso para determinar el genotipo de un individuo.

30 “Haplotipo” – Una secuencia 5’ a 3’ de nucleótidos hallada en uno o más sitios polimórficos en un locus en un solo cromosoma de un solo individuo. Según se utiliza en este documento, haplotipo incluye un haplotipo completo y/o un subhaplotipo según lo descrito más adelante.

“Haplotipo completo” – La secuencia 5’ a 3’ de nucleótidos hallada en todos los sitios polimórficos conocidos en un locus en un solo cromosoma de un solo individuo.

35 “Subhaplotipo” – La secuencia 5’ a 3’ de nucleótidos vista en un subgrupo de los sitios polimórficos conocidos en un locus en un solo cromosoma de un solo individuo.

“Par de haplotipos” – Los dos haplotipos hallados para un locus en un solo individuo.

“Haplotipificación” – Un proceso para determinar uno o más haplotipos en un individuo e incluye la utilización pedigríes familiares, técnicas moleculares y/o inferencia estadística.

40 “Datos haplotípicos” – Información acerca de uno o más de los siguientes puntos para un gen específico: un listado de los pares de haplotipos en cada individuo en una población; un listado de los diferentes haplotipos en una población; la frecuencia de cada haplotipo en esta u otras poblaciones, y cualquier asociación conocida entre uno o más haplotipos y una característica.

45 “Isoforma” – Una forma particular de un gen, ARNm, ADNc o la proteína codificada por los mismos, distinguida de otras formas por su secuencia y/o estructura particulares.

“Isogen” – Una de las isoformas de un gen hallada en una población. Un isogen contiene todos los polimorfismos presentes en la isoforma particular del gen.

50 “Aislado” – Aplicado a una molécula biológica tal como ARN, ADN, un oligonucleótido o una proteína, aislado significa que la molécula está sustancialmente libre de otras moléculas biológicas tales como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, carbohidratos, u otro material tal como desechos celulares y medios de cultivo. Generalmente, el término “aislado” no tiene por objeto referirse a una ausencia completa de tal material o a la ausencia de agua,

tampones o sales, a no ser que estén presentes en cantidades que interfieran sustancialmente con los métodos de la presente invención.

“Ligamiento” – describe la tendencia de los genes a ser heredados juntos como resultado de su localización en el mismo cromosoma; medido según el porcentaje de recombinación entre loci.

5 “Desequilibrio de ligamiento” – describe una situación en la que algunas combinaciones de marcadores genéticos se presentan más o menos frecuentemente en la población de lo que sería de esperar por su distancia. Implica que un grupo de marcadores ha sido heredado coordinadamente. Puede resultar de una recombinación reducida en la región o de un efecto fundador, en el que no ha habido tiempo suficiente para alcanzar un equilibrio desde que uno de los marcadores fue introducido en la población.

10 “Locus” – Una posición en un cromosoma o una molécula de ADN que corresponde a un gen o a un rasgo físico o fenotípico.

“Natural” – Un término utilizado para designar que el objeto al que se le aplica, p.ej., polinucleótido o polipéptido natural, puede ser aislado de una fuente presente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionalmente por el ser humano.

15 “Par de nucleótidos” – Los nucleótidos hallados en un sitio polimórfico en las dos copias de un cromosoma de un individuo.

“Fasado” – Aplicado a una secuencia de pares de nucleótidos para dos o más sitios polimórficos en un locus, fasado (phased) significa que la combinación de nucleótidos presentes en estos sitios polimórficos en una sola copia del locus es conocida.

20 “No fasado” – Aplicado a una secuencia de pares de nucleótidos para dos o más sitios polimórficos en un locus, no fasado (unphased) significa que la combinación de nucleótidos presentes en estos sitios polimórficos en una sola copia del locus no es conocida.

“Grupo de población” – Un grupo de individuos que comparten una característica común tal como el origen etnogeográfico, patología médica, respuesta al tratamiento, etc.

25 “Población de referencia” – Un grupo de sujetos o individuos de los que se predice que son representativos de 1 o más características del grupo de población. Típicamente, la población de referencia representa la variación genética en la población con un nivel de certeza de al menos un 85%, preferentemente de al menos un 90%, más preferentemente de al menos un 95% y aún más preferentemente de al menos un 99%.

30 “Sujeto” – Un individuo humano cuyos genotipos o haplotipos o cuya respuesta al tratamiento o cuyo estado de enfermedad han de ser determinados.

“Tratamiento” – Un estímulo administrado interior o exteriormente a un sujeto.

#### Referencias citadas

35 Adicionalmente, todos los números de acceso de GenBank, números de clusters y números de acceso de proteínas de Unigene citados en este documento quedan incorporados a este documento por referencia en su totalidad y a todos los efectos en la misma medida como si cada uno de estos números se indicara específica e individualmente para ser incorporado por referencia en su totalidad a todos los efectos.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la capacidad de respuesta de un individuo con un trastorno psicótico al tratamiento con loperidona, que comprende;
  - 5 (a) determinar, para las dos copias del gen del CNTF presentes en el individuo, la identidad de un nucleótido en el sitio polimórfico en CNTF 103 G > A en la secuencia GenBank con No. de referencia X55890 (Versión 1); y
  - 10 (b) asignar el individuo a un grupo de respondedores buenos si los nucleótidos en el sitio polimórfico del CNTF en 103 G > A son G en ambas copias del gen del CNTF,

donde dicho método es realizado ex vivo.
- 15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el paso de determinación (a) comprende además la utilización de un kit para la identificación del patrón de polimorfismo de un paciente en el sitio polimórfico del CNTF en 103 G > A, comprendiendo dicho kit un medio para determinar un patrón de polimorfismo genético en el sitio polimórfico del CNTF en 103 G > A.
- 20 3. El método de la reivindicación 2, en el que el equipo comprende además un medio de recolección de muestras de ADN.
4. El método de la reivindicación 2 ó 3, en el que el medio para determinar un patrón de polimorfismo genético en el sitio polimórfico del CNTF en 103 G > A comprende al menos un oligonucleótido para la genotipificación del CNTF.
- 25 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el medio para determinar el patrón de polimorfismo genético en el sitio polimórfico del CNTF en 103 G > A comprende dos oligonucleótidos para la genotipificación del CNTF.
- 30 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que el medio para determinar el patrón de polimorfismo genético en el sitio polimórfico del CNTF en 103 G > A comprende al menos una composición cebadora de genotipificación del CNTF que comprende al menos un oligonucleótido para la genotipificación del CNTF.
- 35 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la composición cebadora para la genotipificación del CNTF comprende al menos dos juegos de pares de cebadores alelo-específicos.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que los dos oligonucleótidos para la genotipificación del CNTF están empaquetados en recipientes separados.

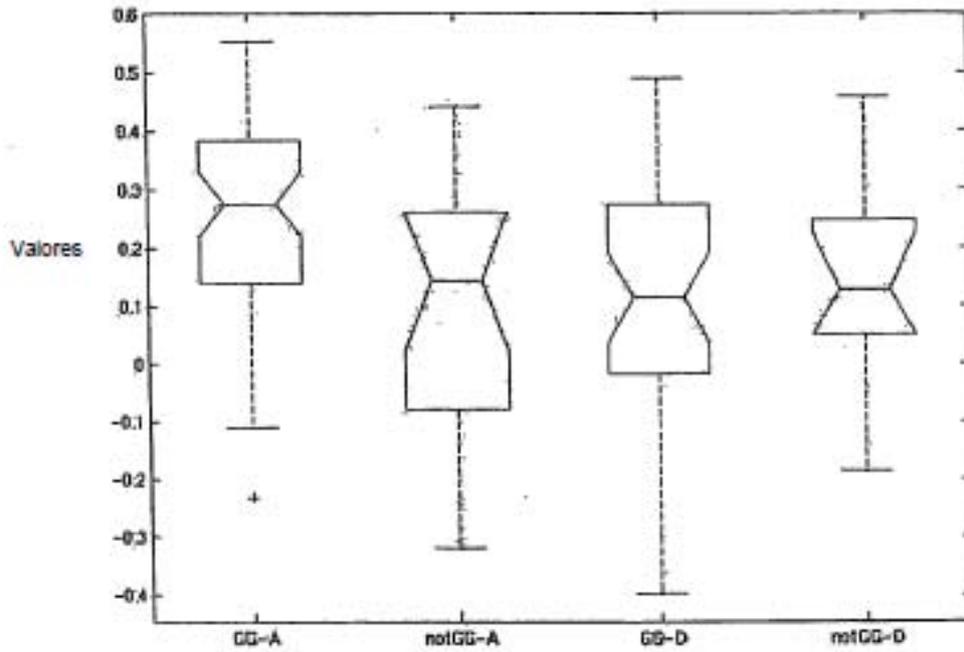


Figura 1: Cambio porcentual medio en GG TOTPANSS y no-GG TOTPANSS

**GG-A:** dosis loperidona A (12-16 mg), solamente individuos GG  
**notGG-A:** dosis loperidona A (12-16 mg), Individuos sin genotipo GG  
**GG-D:** placebo, solamente individuos GG  
**notGG-D:** placebo, Individuos sin genotipo GG  
 + - valor-errático