

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2004.05.03	(73) Titular(es): ARACLÓN BIOTECH, S. L. PASEO DE SAGASTA, 17, 2 .IZDA 50008 ZARAGOZA ES
(30) Prioridade(s): 2003.05.08 ES 200301054	
(43) Data de publicação do pedido: 2009.07.01	
(45) Data e BPI da concessão: 2013.05.22 160/2013	(72) Inventor(es): MANUEL SARASA BARRIO ES
	(74) Mandatário: LUÍS MANUEL DE ALMADA DA SILVA CARVALHO RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **TRATAMENTO PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER**

(57) Resumo:

MÉTODO DE TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER. O INVENTO ESTÁ RELACIONADO COM ANTICORPOS QUE SÃO USADOS NA PREPARAÇÃO DE UM MEDICAMENTO PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE ALZHEIMER. MAIS ESPECIFICAMENTE, O INVENTO ESTÁ RELACIONADO COM O USO DE UM ANTICORPO QUE RECONHECE ESPECIFICAMENTE QUALQUER UMA DAS VARIANTES PREDOMINANTES DO PÉPTIDO AMILÓIDE BETA, AB40 E AB42, NA PREPARAÇÃO DE UM MEDICAMENTO QUE É USADO PARA PREVENIR E/OU TRATAR A DOENÇA DE ALZHEIMER.

RESUMO

"TRATAMENTO PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER"

Método de tratamento da doença de Alzheimer. O invento está relacionado com anticorpos que são usados na preparação de um medicamento para o tratamento da doença de Alzheimer. Mais especificamente, o invento está relacionado com o uso de um anticorpo que reconhece especificamente qualquer uma das variantes predominantes do péptido amilóide beta, Ab40 e Ab42, na preparação de um medicamento que é usado para prevenir e/ou tratar a doença de Alzheimer.

DESCRIÇÃO

"TRATAMENTO PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER"

O presente invento proporciona meios para o tratamento e/ou prevenção de doenças associadas à presença de depósitos amilóides, as quais incluem a doença de Alzheimer.

Estado da arte

São conhecidos alguns factos acerca dos fenómenos bioquímicos e metabólicos associados à presença da doença de Alzheimer (AD). Duas alterações estruturais e histopatológicas observadas nos cérebros dos que possuem AD são os emaranhados neurofibrilares (NFT) e os depósitos amilóides. Os emaranhados neurofibrilares intraneuronais estão também presentes noutras doenças neurodegenerativas, mas a presença de depósitos amilóides tanto nos espaços intraneuronais (placas neuríticas) como perto da microvasculatura (placas vasculares) parece ser característica de AD. Destes, as placas neuríticas parecem ser as mais comuns (Price, D.L., e colaboradores, Drug Development Research (1985) 5:59-68).

O principal componente destas placas amilóides é um péptido de 40-42 aminoácidos designado péptido amilóide

A β 4.

O péptido amilóide A β 4 é um péptido que tem origem na proteólise de glicoproteínas de membrana designadas proteínas precursoras do péptido amilóide A β 4 (β APP). Estas proteínas, precursoras do péptido amilóide, consistem em 695 a 770 aminoácidos, todos eles sendo codificados pelo mesmo gene.

Foram identificadas duas variantes principais do péptido amilóide A β 4, os péptidos A β 40 e A β 42, contendo respectivamente 40 e 42 aminoácidos, os quais apresentam diferentes distribuições tecidulares em condições fisiológicas e patológicas. A variante de 42 aminoácidos é a forma predominante nas placas amilóides localizadas nos cérebros de doentes com AD.

Até agora, foram propostas diferentes soluções possíveis para proporcionar uma possível vacina contra AD.

Em EP526511, foi proposta a administração de doses homeopáticas de A β a doentes com AD pré-estabelecida. No entanto, devido às doses usadas, os níveis de A β circulante endógeno no plasma dificilmente variaram, e assim não foi expectável qualquer benefício terapêutico.

Schenk et al., (Nature, 1999; 400: 173-177) descrevem a imunização com A β 42 de murganhos transgénicos PDAPP, que expressavam em excesso APP humana mutante,

prevenindo assim a formação de placas amilóides, distrofia neurítica e astrogliose.

Em W09927944 (Schenk D.), é descrito um tratamento para AD através da administração a um doente de A β 42.

Um ensaio clínico de fase III em 360 doentes diagnosticados com AD média a moderada em 4 países Europeus e nos Estados Unidos, em que o péptido amilóide A β 42 foi usado como antigénio, foi descontinuado após ser descrita encefalite nalguns doentes (Scrip Daily Online, 25 Feb 2002, S007455320, The Scientist 16 [7]: 22, April 1, 2002).

O problema de usar uma proteína endógena como vacina (ou uma proteína presente naturalmente no animal que é vacinado), como é o caso do péptido A β 42, é o organismo responder fazendo anticorpos contra A β 42 e contra fracções mais pequenas que podem também ter funções fisiológicas até agora desconhecidas. Entre alguns potenciais problemas que podemos mencionar está o possível desenvolvimento de doenças auto-imunes devido à geração de anticorpos contra a proteína endógena, dificuldade na geração de uma resposta imune devido à falência do sistema imune em reconhecer antigénios endógenos e possível desenvolvimento de uma resposta inflamatória aguda.

O presente invento destina-se ao tratamento da doença de Alzheimer e de outras doenças amilóides através

da administração de um péptido, da parte C terminal de A β , conjugado com uma proteína, em que numa realização preferida do presente invento a referida proteína é a hemocianina de lapa.

Descrição do invento

O presente invento está definido nas reivindicações.

Em particular, o invento é dirigido ao uso de um péptido conjugado com uma proteína, que actua como um imunogénio para a produção de anticorpos capazes de reconhecerem especificamente qualquer uma das variantes predominantes dos péptidos amilóides beta A β 40 e A β 42 e de reduzirem a acumulação de placas amilóides, na preparação de um medicamento para a prevenção e/ou tratamento de uma doença seleccionada do grupo que compreende diabetes tipo II, tremor epizoótico, encefalite espongiforme bovina, doença de Creutzfeldt-Jakob, doença de Alzheimer e angiopatia amilóide cerebral, caracterizado por o péptido ser o péptido de SEQ ID NO:3. O invento é igualmente dirigido ao uso de um anticorpo ou de um fragmento activo ou derivado de um anticorpo que especificamente reconhece qualquer uma das variantes predominantes do péptido amilóide beta, A β 40 e A β 42 e reduz a acumulação de placas amilóides, na preparação de um medicamento para a prevenção e/ou tratamento de uma doença seleccionada do grupo que compreende diabetes tipo II, tremor epizoótico, encefalite

espongiforme bovina, doença de Creutzfeldt-Jakob, doença de Alzheimer e angiopatia amilóide cerebral, em que o anticorpo ou o fragmento activo ou derivado de anticorpo que especificamente reconhece qualquer uma das variantes predominantes do péptido A β é obtido a partir de um péptido de SEQ ID NO 3.

O presente invento está relacionado com uma vacina para a prevenção e/ou tratamento de doença de Alzheimer e de outras doenças amilóides relacionadas.

De acordo com uma realização preferida do presente invento, é proporcionada uma vacina para a prevenção e/ou tratamento da doença de Alzheimer e de outras doenças relacionadas, que ultrapassa as desvantagens associadas com a utilização de péptidos, proteínas ou imunogénios endógenos.

Exemplos de outras doenças caracterizadas por depósitos amilóides são a síndrome hereditária Islandesa, mieloma múltiplo e encefalite espongiforme, incluindo a doença de Creutzfeldt-Jakob.

A introdução de uma resposta imune pode ser activa, como quando um imunogénio é administrado para induzir anticorpos que reagem com A β num doente, ou passiva, como quando é administrado um anticorpo que reage por si só com A β num doente.

Para fins do presente invento, os termos seguintes são definidos como se segue:

O termo "doenças amilóides relacionadas" inclui doenças associadas com a acumulação de amilóide que pode ser restringida a um órgão, amiloidose localizada, ou disseminada por vários órgãos, amiloidose sistémica. As formas localizadas de amiloidose incluem mas não estão limitadas a diabetes tipo II, tremor epizoótico, encefalite espongiforme bovina, doença de Creutzfeldt-Jakob, doença de Alzheimer e angiopatia amilóide cerebral.

O termo "imunização passiva" é usado para relacionar com a administração de anticorpos ou fragmentos dos mesmos a um indivíduo com a intenção de conferir imunidade ao indivíduo.

É aqui descrito o uso de um péptido que actua como um imunogénio ou como um anticorpo, na preparação de um medicamento para a prevenção e/ou tratamento de uma doença caracterizada pela acumulação de depósitos amilóides. Os referidos métodos consistem na indução de uma resposta imune contra um componente peptídico dos depósitos amilóides no doente. A referida indução poderá ser activa, através da administração de um imunogénio, ou passiva, através da administração de um anticorpo ou de um fragmento activo ou derivado de um anticorpo.

Numa realização preferida do presente invento, a

doença é a doença de Alzheimer.

A medicação obtida pode ser usada em doentes assintomáticos e sintomáticos, tais como os que apresentam sintomas da doença.

As composições capazes de provocar uma resposta imune dirigida contra determinados componentes das placas amilóides são eficazes para o tratamento ou prevenção de doenças relacionadas com depósitos amilóides. Em particular, de acordo com um aspecto aqui descrito, é possível prevenir a progressão, reduzir os sintomas e/ou reduzir o processo de deposição de amilóide num indivíduo, quando uma dose imuno-estimuladora de um péptido ou de um anticorpo obtido a partir dele é administrado ao doente.

De acordo com um aspecto do presente invento, os anticorpos são obtidos através da imunização de mamíferos ou aves através do uso de um péptido conjugado com uma proteína como um imunogénio.

De acordo com uma realização preferida do presente invento, o mamífero usado para imunização pode ser ruminante, equino, lagomorfo, carnívoro, primata ou qualquer outro animal que permita que sejam extraídas quantidades adequadas de soro para o anticorpo. Entre as aves usada para imunização, podemos mencionar, embora não lhes estando limitados, galiformes, anseriformes e columbiformes, entre outros.

Descreve-se igualmente o uso de um péptido conjugado com uma proteína, que actua como um imunogénio para produzir anticorpos capazes de reconhecer especificamente quaisquer variantes predominantes do péptido amilóide beta A β 40 e A β 42, na preparação de um medicamento para a prevenção e/ou tratamento de uma doença caracterizada pela acumulação de depósitos amilóides no cérebro de um doente.

De acordo com a realização mais preferida do presente invento, a proteína usada para conjugação com o péptido é a proteína de lapa.

De acordo com o presente invento, o péptido é o péptido de SEQ ID NO:3

É igualmente descrito o uso de um anticorpo ou de um fragmento activo ou derivado de um anticorpo que especificamente reconhece qualquer uma das variantes predominantes do péptido amilóide beta, A β 40 e A β 42, na preparação de um medicamento para a prevenção e/ou tratamento de uma doença caracterizada pela acumulação de depósitos amilóides no cérebro de um doente.

De acordo com o presente invento, o anticorpo ou um seu fragmento activo ou derivado do anticorpo que especificamente reconhece qualquer uma das variantes predominantes do péptido A β é obtido a partir do péptido de SEQ ID NO:3.

Numa outra realização mais preferida, o referido anticorpo ou fragmento activo ou derivado de anticorpo é obtido através da imunização de mamíferos ou de aves com o péptido de SEQ ID NO:3.

Neste pedido, os aminoácidos são abreviados usando os códigos de uma única letra aceite na área, como indicado abaixo:

A= Ala = alanina

C= Cys= cisteína

D= Asp= ácido aspártico

E= Glu= ácido glutâmico

F= Phe= fenilalanina

G= Gly= glicina

H= His= histidina

I= Ile= isoleucina

K= Lys= lisina

L= Leu= leucina

M= Met= metionina

N= Asn= asparagina

P= Pro= prolina

Q= Gln= glutamina

R= Arg= arginina

S= Ser= serina

T= Thr= treonina

V= Val= valina

W= Trp= triptofano

Y= Tir= tirosina

A sequência descrita no presente invento e identificada como SEQ ID NO:3 corresponde à seguinte sequência de aminoácidos:

SEQ ID NO3 GLMVGGVVIA

Ao anticorpo obtido a partir do péptido anterior foi atribuído o código SAR-4 correspondendo ao apresentado abaixo:

SEQ ID NO3 SAR-4

A informação relacionada com a identificação das sequências peptídicas, descritas no presente invento, que acompanham o presente documento num formato legível em computador, está indicada na lista de sequências que é apresentada juntamente com este documento.

Exemplos

O presente invento é ilustrado por meio dos exemplos que se seguem.

Exemplo 1. Geração de anticorpos policlonais

O anticorpo policlonal contra o péptido conjugado com KLH que foram usados como imunogénio foi gerado por imunização em coelhos brancos da Nova Zelândia.

O imunogénio foi injectado em dois coelhos, com cinco injeções em cada coelho: a primeira injeção intradérmica do conjugado péptido-KLH em PBS e emulsionado em adjuvante completo de Freund e mais quatro injeções intramusculares, como uma dose de reforço nos dias 14, 28, 49 e 80, do mesmo conjugado péptido-KLH em PBS mas desta vez emulsionado em adjuvante incompleto de Freund, com colheita de sangue 90 dias depois para detectar a presença de anticorpos.

Após colheita do sangue, o soro foi separado e pré-purificado através de remoção de sal e depois o anticorpo foi purificado por afinidade numa matriz compreendendo 1,5 ml de material activado com EMD-Epoxi (Merck) a que foi adicionado 5 mg do péptido correspondente. As fracções purificadas foram ajustadas a 0,1% de BSA (Sigma) e guardadas a 4°C, podendo ser adicionado 20-50% de glicerol como crioprotector.

Exemplo 2. Transferência Western para A β

1. Electroforese

Usou-se o método de Laemmli, descrito em "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, New York, 1998, modificado para melhorar a separação de pequenos péptidos.

O sistema usado foi um Miniprotean 3 da Bio-Rad.

Usou-se um gel de 15% de acrilamida, com mistura dos seguintes componentes:

Soluções stock	Gel de separação (15%)	Gel de concentração
40% acrilamida	3.75 ml	500 µl
Tris 3M, pH= 8,45	3,3 ml	250 µl
Glicerol	1,05 ml	-
Água	1,9 ml	4,2 µl
20% SDS	50 µl	18,6 µl
10% APS	50 µl	25 µl
TEMED	10 µl	5 µl

Foram usadas soluções stock iniciais de 1 mg/ml dos péptidos A β 40 e A β 42 (dissolvidos em PBS). O volume necessário foi retirado destas soluções para cada uma das amostras e ajustado a 20 µl com SBL + Tris base 2M). As amostras foram então fervidas durante 5 minutos para desnaturar os péptidos e eliminar possíveis proteases.

O centro da tina foi preenchido com tampão do cátodo e o exterior com tampão do ânodo, a composição destes tampões é a seguinte.

Tampão do ânodo

24,2 g de Tris base (concentração final 0,2M).

Diluir para 1 litro com H₂O.

Ajustar a pH 8,9 com HCl concentrado.

Guardar a 4°C até 1 mês.

Tampão do cátodo

12,11 g de Tris base (concentração final 0,1M).

17,92 g de tricina (concentração final 0,1M).

1g de SDS (0,1% concentração final).

Diluir para 1 litro com H₂O.

Não ajustar o pH.

Guardar a 4°C até 1 mês.

Finalmente as amostras foram aplicadas nos alvéolos: 20 µl/alvéolo. Usando o Polypeptide Standard Kaleidoscope da Bio-Rad como marcador, a migração começou numa voltagem baixa (30 V) e depois a voltagem foi aumentada para 100 V, após aproximadamente 1 hora de electroforese.

2. Transferência para membrana

As proteínas separadas no gel foram transferidas para membrana PVDF através de electrotransferência. Nas sanduíches colocou-se o seguinte

Lado preto - esponja - 3 papéis Whatmann (ou papéis de filtro) - gel - 3 papéis Whatmann - esponja - lado transparente.

A tina foi então cheia com tampão de electrotransferência.

Glicina 38 mM

Tris base 50 mM

Metanol 40%

A transferência foi realizada durante 2 horas a 200 mA. Durante a transferência, o tampão foi mantido em agitação com a barra magnética.

3. Incubação com anticorpos

O anticorpo e o leite em pó foram dissolvidos em PBS-t (PBS + 0,5% Tween 20), fazendo as lavagens igualmente com PBS-T.

Após a transferência, a superfície da membrana foi bloqueada com solução a 5% de leite em pó, durante 1 hora, com agitação e à temperatura ambiente (t.a.).

Após isto, a membrana foi lavada durante 2 x 5 minutos à t.a.

Em seguida, foi incubada com anticorpo primário (SAR-4) durante 1 hora à t.a. diluído pelo menos a 1:500 em PBS-T.

A membrana foi lavada: 3x 10 minutos à t.a. Em seguida, foi incubada com anticorpo secundário: cabra anti-coelho-HRP durante 1 hora à t.a. (1:10000 em todos os casos).

A lavagem da membrana foi repetida mais uma vez:
3 x 10 minutos à t.a.

4. Revelação

Após a última lavagem, a membrana foi incubada com a solução do kit de quimioluminescência, usando o kit ECL+Plus da Pharmacia.

A membrana foi envolvida em celofane e exposta a filme de dupla emulsão (Hyperfilm MP da Amersham), durante diferentes tempos entre 30 segundo e 2 minutos.

Exemplo 3. Imuno-histoquímica com anticorpos SAR-4 no tecido de cérebro humano.

As secções de tecido foram fixadas em parafina seguindo os seguintes passos:

- a) fixação em formol neutro a 10%
- b) desidratação através de passos sucessivos em concentrações crescentes de álcool
- c) passagens através de xilol e parafina, este último passo na estufa a 60-62°C.
- d) obtenção de blocos de parafina, os quais foram cortados em 4 microns e montados em lâminas.

As secções foram então desparafinizadas através da passagem pelas seguintes soluções:

Xilol 100%	10 minutos
Xilol 100%	10 minutos
Etanol 100%	5 minutos
Etanol 100%	5 minutos
Etanol 96%	5 minutos
Etanol 96%	5 minutos
Etanol 90%	5 minutos
Etanol 70%	5 minutos
PBS	5 minutos x 3 vezes

Em seguida foram tratadas da seguinte forma:

- a) 96% de ácido fórmico durante 3 minutos numa hote química e com agitação
- b) Lavagem rápida com água
- c) Lavagem em PBS 2 x 5 minutos
- d) Bloqueio das peroxidases endógenas durante 15 minutos numa solução constituída por 70 ml de PBS, 30 ml de metanol e 1 ml de H₂O₂
- e) Lavagem em PBS 3 x 5 minutos
- f) Lavagem com PBS/T (triton ou Tween-20 a 0,5% em PBS) 3 x 5 minutos
- g) Bloqueio da ligação não específica com soro de cabra (Soro de cabra normal) diluído a 10:100 em PBS/T durante duas horas
- h) Incubação do anticorpo primário toda a noite a 4°C numa câmara húmida:

SAR-4... Diluição 1:2000 em PBS

- i) Lavagem em PBS/T 3 x 5 minutos
- j) Incubação em anticorpo secundário (cabra anti-coelho) diluído a 1:200 em PBS durante 45 minutos
- k) Lavagem em PBS 4 x 5 minutos
- l) Incubação de ABC (complexo avidina-biotina) da Vector Labs numa diluição de 1:100 em PBS/T durante 45 minutos no escuro, mantendo estas condições até a revelação estar finalizada
- m) Lavagem em PBS 3 x 5 minutos
- n) Revelação em diaminobenzidina (DAB)

O tempo foi controlado empiricamente ao estereomicroscópio. Para tal, primeiro foi feita uma lavagem numa solução de Tris-HCl 0,5M durante 10 minutos com agitação, para depois continuar a incubação com um substrato diaminobenzidina (DAB) diluído em Tris-HCl 0,5M e ao qual se adicionou 0,5 µl/ml de H₂O₂ a 4°C. Uma vez terminada a reacção, foram feitas três lavagens com PBS a 4°C durante 5 minutos de cada vez e depois foi feita desidratação em etanol a 70%, 90% e 100% durante 2 minutos da cada vez, passando através de xilol durante 4 minutos e ainda mais um passo através de xilol durante 2 minutos, até serem montados com Eukitt para observação ao microscópio.

Lista de sequências

NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 1

INFORMAÇÃO SOBRE A SEQUÊNCIA 1:

CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

COMPRIMENTO: 10

TIPO: aminoácido

TIPO DA MOLÉCULA: péptido

FONTE: Síntese química

DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA:

SEQ ID NO 3

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
1 5 10

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> ARACLON BIOTECH, S.L.

<120> Método para o tratamento da doença de Alzheimer.

<130> EP1513.A.2.div2

<160> 4

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> "misc_feature"

<400> 1

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> "misc_feature"

<400> 2

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
1 5

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> misc_feature

<400> 3

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 1 5 10

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> "misc_feature"

<400> 4

Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10

Lisboa, 6 de Agosto de 2013

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de um péptido conjugado com uma proteína, o qual actua como um imunogénio para a produção de anticorpos capazes de especificamente reconhecerem qualquer uma das variantes predominantes do péptido amilóide beta A β 40 e A β 42 e reduzirem a acumulação de placas amilóides, na preparação de um medicamento para a prevenção e/ou tratamento de uma doença seleccionada do grupo que compreende diabetes tipo II, tremor epizoótico, encefalite espongiforme bovina, doença de Creutzfeldt-Jakob, doença de Alzheimer e angiopatia amilóide cerebral, caracterizado por o péptido ser o péptido de SEQ ID NO:3.

2. O uso de acordo com a reivindicação anterior, caracterizado por a doença ser a doença de Alzheimer.

3. O uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a doença ser angiopatia amilóide cerebral.

4. O uso de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizado por a proteína ser proteína de lapa (KLH).

5. Uso de um anticorpo ou de um fragmento activo de um anticorpo que especificamente reconhece

qualquer uma das variantes predominantes do péptido amiloide beta, A β 40 e A β 42 e reduz a acumulação de placas amilóides, na preparação de um medicamento para a prevenção e/ou tratamento de uma doença seleccionada do grupo que compreende diabetes tipo II, tremor epizoótico, encefalite espongiforme bovina, doença de Creutzfeldt-Jakob, doença de Alzheimer e angiopatia amiloide cerebral, em que o anticorpo ou o fragmento activo ou derivado do anticorpo que especificamente reconhece qualquer uma das variantes predominantes do péptido A β é obtido a partir de um péptido de SEQ ID NO3.

6. O uso de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por a doença ser doença de Alzheimer.

7. O uso de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por a doença ser angiopatia amiloide cerebral.

8. O uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 5-7, caracterizado por o referido anticorpo ou fragmento activo ou derivado de anticorpo ser obtido através de imunização, de mamíferos ou aves, com o péptido de SEQ ID NO:3.

Lisboa, 6 de Julho de 2013

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

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

Documentos de patentes citadas na descrição

- EP 526511 A
- WO 9927944 A, Schenk D.

Literatura que não é de patentes citada na descrição

- PRICE, D.L. *Drug Development Research*, 1985, vol.5, 59-68
- SCHENK et al. *Nature*, 1999, vol. 400, 173-177
- *Scrip Daily Online*, 25 February 2002
- *The Scientist*, 01 April 2002, vol. 16 (7), 22
- *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, 1998