INPI
INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) *Número de Publicação:* PT 730643 E

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
C12N015/00 A C12N015/12 B
C07K014/47 B A01K067/027 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito:* 1994.10.18

(30) *Prioridade:* 1993.10.27 US 143697
1993.11.01 US 148211

(43) *Data de publicação do pedido:*
1996.09.11

(45) *Data e BPI da concessão:*
2001.01.10

(73) *Titular(es):*
ELAN PHARMACEUTICALS, INC.
3760 HAVEN AVENUE MENLO PARK, CA 94025-1057 US

ELI LILLY AND COMPANY
LILLY CORPORATE CENTER INDIANAPOLIS, IN 46285 US

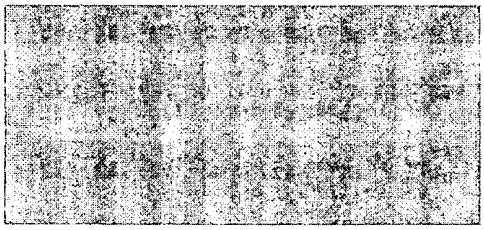
(72) *Inventor(es):*
LISA C. MCCONLOGUE US
JUN ZHOA US
SUKANTO SINHA US

(74) *Mandatário(s):*
ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* ANIMAIS TRANSGÉNICOS PORTADORES DO ALELO DE APP COM MUTAÇÃO SUECA

(57) *Resumo:*

ANIMAIS TRANSGÉNICOS PORTADORES DO ALELO DE APP COM MUTAÇÃO SUECA



DESCRIÇÃO

"Animais transgénicos portadores do alelo de APP com mutação sueca"

CAMPO TÉCNICO

A invenção refere-se a animais transgénicos, que não humanos, e células de mamífero transgénicas, que não de humanos, portadores de um transgene que codifica uma proteína precursora amilóide (APP) compreendendo a mutação sueca, (lisina^{595}-metionina^{596}) mutado para (asparagina^{595}-leucina^{596}); a invenção refere-se também a animais e células, que não humanos, compreendendo um transgene que codifica uma APP compreendendo a mutação sueca e compreendendo adicionalmente *loci* do gene de APP endógeno funcionalmente corrompido, construções de transgenes e de direccionamento utilizadas para produzir estas células e animais transgénicos, e transgenes que codificam sequências de polipéptidos de APP humana com mutação sueca. A presente invenção proporciona a utilização de animais transgénicos na pesquisa farmacêutica e de animais de investigação comercial para modelar doenças neurodegenerativas (*e.g.*, doença de Alzheimer) e a bioquímica da APP *in vivo*.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença progressiva genericamente conhecida como demência senil. De um modo alargado, a doença cai em duas categorias, nomeadamente de início tardio e de início precoce. O início tardio, que ocorre em idade avançada (mais de 65 anos), pode ser causado pela atrofia natural do cérebro que ocorre a uma velocidade maior e num grau mais grave do que o normal. A DA de início precoce é muito menos frequente mas apresenta uma demência patologicamente idêntica com atrofia do cérebro que se desenvolve bem antes do período senil, *i.e.*, entre os 35 e os 60 anos de idade.

A doença de Alzheimer caracteriza-se pela presença de numerosas placas amilóides e emaranhados neurofibrilhares (agregados proteicos altamente insolúveis) presentes nos cérebros de pacientes de DA, em particular nas regiões envolvidas na memória e na cognição. Enquanto no passado houve um debate científico significativo sobre o facto de se placas e emaranhados são uma causa ou se são meramente o resultado da DA, descobertas recentes indicam que a placa amilóide é um precursor ou factor causador. Em particular,

verificou-se que a produção de péptido β-amilóide, um constituinte principal da placa amilóide, pode resultar de mutações no gene que codifica a proteína precursora amilóide, uma proteína que, quando normalmente processada, não produzirá o péptido β-amilóide. Presentemente, crê-se que um processamento normal (não patogénico) da proteína precursora β-amilóide ocorre através de clivagem por uma "α-secretase" putativa que cliva entre os aminoácidos 16 e 17 da proteína. Crê-se ainda que o processamento patogénico ocorre através de uma "β-secretase" putativa no terminal amino do péptido β-amilóide dentro da proteína precursora. Adicionalmente, o péptido β-amilóide parece ser tóxico para os neurónios do cérebro, e a morte de células neuronais está associada a esta doença.

O péptido β-amilóide (também referido como A4, βAP, Aβ, ou AβP; veja-se, Pat. dos EUA N°. 4 666, 829 e Glenner e Wong (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120: 1131) é derivado de proteína precursora β-amilóide (βAPP), que é expressa em formas unidas de formas diferentes de 695, 751, e 770 aminoácidos. Veja-se, Kang *et al.* (1987) *Nature* 325: 773; Ponte *et al.* (1988) *Nature* 331: 525; e Kitaguchi *et al.* (1988) *Nature* 331: 530. O processamento normal da proteína precursora amilóide envolve a clivagem proteolítica num local entre os resíduos Lys^{16} e Leu^{17} (tal como numerados para a região νAP onde Asp^{597} é o resíduo 1 em Kang *et al.* (1987)), *supra*, próximo do domínio transmembranar, resultando na secreção constitutiva de um domínio extracelular que conserva a restante porção da sequência do péptido β-amilóide (Esch *et al.* (1990) *Science* 248:1122-1124). Esta via parece ser amplamente conservada entre espécies e estar presente em muitos tipos de células. Veja-se, Weidemann *et al.* (1989) *Cell* 57:115-126 e Oltersdorf *et al.* (1990) *J. Biol. Chem.* 265:4492-4497. Esta via normal cliva dentro da região da proteína precursora que corresponde ao péptido β-amilóide, impedindo assim, aparentemente, a sua formação. Notou-se outra forma de βAPP segregada constitutivamente (Robakis *et al. Soc. Neurosci.* 26 de Out., 1993, Resumo N°. 15.4, Anaheim, CA) que contém mais do terminal carboxi da sequência de β-AP do que a forma descrita por Esch *et al. supra*.

Golde *et al.* (1992) *Science* 255:728-730, prepararam uma série de mutantes de deleção de proteína precursora amilóide e observaram um único local de clivagem dentro da região do péptido β-amilóide. Com base nesta

observação, postulou-se que a formação do péptido β-amilóide não envolve uma via secretora. Estus *et al.* (1992) *Science* 255:726-728, ensinam que os dois maiores fragmentos proteolíticos do terminal carboxi da proteína precursora amilóide encontrados em células cerebrais contêm toda a região do péptido β-amilóide.

Relatórios recentes mostram que o péptido β-amilóide solúvel é produzido por células saudáveis em meios de cultura (Haass *et al.* (1992) *Nature* 359:322-325) e em CSF humanos e animais (Seubert *et al.* (1992) *Nature* 359:325-327). Palmert *et al.* (1989) *Biochm. Biophys. Res. Comm.* 165:182-188, descrevem três possíveis mecanismos de clivagem para a βAPP e apresentam provas de que a clivagem de βAPP não ocorre na metionina^{596} na produção de derivados solúveis de βAPP. A Pat. dos EUA Nº. 5 200 339, discute a existência de certos factores proteolíticos que são capazes, de forma putativa, de clivar βAPP num local próximo do terminal amino de βAPP.

Sabe-se que o gene de APP está localizado no cromossoma 21 humano. Um *locus* que segrega com a doença de Alzheimer familiar foi mapeado no cromossoma 21 (St. George Hyslop *et al* (1987) *Science* 235: 885) próximo do gene de APP. Foram previamente reportados recombinantes entre o gene de APP e o *locus* de DA (Schellenberg *et al.* (1988) *Science* 241: 1507; Schellenberg *et al.* (1991) *Am. J. Hum. Genetics* 48: 563; Schellenberg *et al.* (1991) *Am. J. Hum. Genetics* 49: 511, aqui incorporados por referência).

A identificação de mutações no gene da proteína precursora amilóide que causam doença de Alzheimer familiar de início precoce é prova de que o metabolismo amilóide é o evento central no processo patogénico subjacente à doença. Quatro mutações reportadas causadoras da doença incluem, em relação à isoforma 770, valina^{717} para isoleucina (Goate *et al.* (1991) *Nature* 349: 704), valina^{717} para glicina (Chartier Harlan *et al.* (1991) *Nature* 353: 844), valina^{717} para fenilalanina (Murrell *et al.* (1991) *Science* 254: 97) e, em relação à isoforma 695, uma mutação dupla que altera lisina^{595}-metionina^{596} para asparagina^{595}-leucina^{596} (Mullan *et al.* (1992) *Nature Genet* 1: 345; Citron *et al.* (1992) *Nature* 360: 672) referida como a mutação sueca. Os alelos de APP que são positivamente correlacionados com DA são denominados "alelos associados à doença ".

O desenvolvimento de modelos experimentais da doença de Alzheimer que possam ser utilizados para definir adicionalmente os eventos bioquímicos subjacentes envolvidos na patogénese da DA seria altamente desejável. Tais modelos poderiam presumivelmente ser empregues, numa aplicação, para pesquisar agentes que alterem o curso degenerativo da doença de Alzheimer. Por exemplo, um sistema modelo da doença de Alzheimer poderia ser utilizado para pesquisar factores ambientais que induzem ou aceleram a patogénese da DA. Em oposição, poderia ser utilizado um modelo experimental para pesquisar agentes que inibem, evitam ou invertem a progressão da DA. Presumivelmente, estes modelos poderiam ser empregues no desenvolvimento de fármacos que fossem eficazes para a prevenção, paragem ou inversão da DA.

Infelizmente, apenas humanos e primatas que não humanos em idade avançada desenvolvem quaisquer das características patológicas da DA; a despesa e a dificuldade da utilização de primatas e o período de tempo necessário ao desenvolvimento da patologia da DA tornam a investigação intensiva nestes animais impraticável. Os roedores não desenvolvem DA, mesmo numa idade extrema. Foi reportado que a injecção de proteína β-amilóide (βAP) ou fragmentos citotóxicos de βAP no cérebro de roedores resulta na perda de células e induz um marcador antigénico para componentes de emaranhados neurofibrilhares (Kowall *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88: 7247). Os ratinhos que são portadores de uma cópia extra do gene de APP em resultado de trissomia parcial do cromossoma 16 morrem antes do nascimento (Coyle *et al.* (1988) *Trends in Neurosci.* 11: 390). Desde a clonagem do gene de APP, têm havido várias tentativas para produzir um modelo de ratinho para DA utilizando transgenes que incluem todo ou parte do gene de APP, permanecendo infelizmente muito deste trabalho por publicar uma vez que os ratinhos não eram viáveis ou não apresentavam patologia semelhante a AD. Pelo menos dois relatórios publicados foram retractados devido a irregularidades nos resultados reportados (Marx J., *Science* 255: 1200; Wirak *et al.* (1991) *Science* 253: 323; Kawabata *et al.* (1991) *Nature* 354: 476; Kawabata *et al. Nature* 356: 23; Quon *et al.* (1991) *Nature* 352: 239; Marx, *Science* 259: 457).

Em WO 94/23049 discute-se a introdução de todo o gene de APP humana não arranjado na linha germinativa de ratinhos, para utilização na

formação de ratinhos transgénicos que expressem a proteína APP humana de comprimento completo.

Em WO 91/19810 descrevem-se também ratinhos transgénicos que expressam proteínas relacionadas com a patologia da doença de Alzheimer, *i.e.*, proteínas precursoras do núcleo β-amilóide, proteínas precursoras relacionadas β-amilóides e inibidor de serina-protease.

O presente pedido descreve métodos e composições para a transferência de transgenes e construções de recombinação homóloga para células de mamíferos, especialmente para hemocitoblastos embrionários. Descreve também células transgénicas não humanas e animais transgénicos, que não humanos, que são portadores de um ou mais transgenes de APP com mutação sueca. Um objectivo da presente invenção consiste na aplicação destes animais transgénicos como sistemas *in vivo* para a pesquisa de drogas candidatas quanto à capacidade de inibir ou evitar a produção de placa β-amilóide patogénica. Seria desejável proporcionar métodos e sistemas para a pesquisa de compostos de teste quanto à capacidade de inibir ou evitar a conversão de proteína precursora amilóide em péptido β-amilóide patogénico. Em particular, seria desejável basear estes métodos e sistemas em vias metabólicas que se verificou estarem envolvidas nesta conversão, em que o composto de teste seria capaz de interromper ou interferir na via metabólica que conduz à conversão. Estes métodos e animais transgénicos proporcionariam a pesquisa rápida, económica, e adequada de grandes números de compostos de teste.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De acordo com os objectivos anteriores, num aspecto, a presente invenção proporciona a utilização de um animal ou um hemocitoblasto transgénicos, não humanos, compreendendo um genoma diplóide compreendendo um transgene que codifica um polipéptido de APP heterólogo compreendendo a mutação sueca em que os resíduos de aminoácido correspondentes às posições 595 e 596 na APP^{695} humana são asparagina e leucina, respectivamente, para pesquisar um agente quanto a actividade na prevenção, inibição ou inversão da doença de Alzheimer. Neste aspecto, o animal pode ser murídeo, e o transgene pode ser integrado de forma não homóloga. Opcionalmente, o animal transgénico, que não humano, expressa um polipéptido de APP humana compreendendo a mutação sueca como acima

descrito. O polipéptido de APP heterólogo compreendendo a mutação sueca pode ser expresso sob o controlo transcricional de um promotor de enolase específico de neurónios.

Os animais que não humanos utilizados na invenção são portanto portadores de pelo menos uma cópia de um transgene compreendendo uma sequência polinucleotídica que codifica um polipéptido de APP heterólogo compreendendo a mutação sueca (asparagina^{595}-leucina^{596}) operativamente ligada a uma sequência reguladora da transcrição capaz de produzir expressão do polipéptido de APP heterólogo no animal transgénico, que não humano. O referido polipéptido de APP heterólogo compreendendo a mutação sueca é geralmente expresso em células que normalmente expressam o gene de APP endógeno de ocorrência natural (se presente). Tipicamente, o animal que não humano é um ratinho e o gene de APP heterólogo é um gene de APP humana com mutação sueca. Estes transgenes compreendem tipicamente uma cassete de expressão de APP com mutação sueca, em que um promotor ligado e, preferivelmente, um potenciador, conduzem a expressão de sequências estruturais que codificam um polipéptido de APP heterólogo compreendendo a mutação sueca.

Numa concretização preferida, os animais e as células transgénicos não humanos utilizados na invenção são portadores de um gene de APP associado à doença, intacto, quer seja um alelo humano associado à doença, como um polinucleótido codificando uma proteína APP humana compreendendo a mutação sueca, quer seja uma cópia genómica completa (ou minigene) do gene de APP com mutação sueca.

Noutra concretização preferida, pode-se substituir um alelo de um roedor (*e.g.*, murídeo) mutado que compreende modificações na sequência que corresponde a uma sequência de APP humana compreendendo a mutação sueca. Estirpes de células e linhas de células (*e.g.*, células astrogliais) derivadas destes animais transgénicos têm uma ampla aplicação na arte como modelos experimentais para o desenvolvimento de fármacos para DA e como uma fonte conveniente de proteína APP compreendendo a mutação sueca. Adicionalmente, os animais transgénicos, que não humanos, compreendendo um transgene que codifica uma proteína APP com mutação sueca e sem *loci* do gene de APP endógeno funcionais (*i.e.*, possuindo uma base de anulação

("*knockout*") de APP) são uma fonte conveniente de proteína APP com mutação sueca numa base com falta de outras proteínas APP que não compreendem a mutação sueca.

Noutro aspecto, a presente invenção proporciona a utilização de um transgene que codifica um polipéptido de APP heterólogo compreendendo a mutação sueca em que os resíduos de aminoácido nas posições correspondentes às posições 595 e 596 na APP^{695} humana são asparagina e leucina, respectivamente, para preparar um animal transgénico, que não humano, para a pesquisa de um agente quanto a actividade na prevenção, inibição ou inversão da doença de Alzheimer.

Os transgenes necessários para a prática da invenção compreendem portanto um gene que codifica uma APP com mutação sueca, com o referido gene operativamente ligado a uma sequência reguladora da transcrição funcional no animal transgénico hospedeiro (*e.g.*, um promotor específico de neurónios). Estes transgenes são tipicamente integrados numa localização cromossómica do hospedeiro por integração não homóloga. Os transgenes podem ainda compreender um marcador seleccionável, tal como um gene *neo* ou *gpt* operativamente ligados a um promotor constitutivo, tal como um promotor do gene de fosfoglicerato-quinase (*pgk*) ou um promotor do gene *tk* de HSV, ligados a um potenciador (*e.g.*, potenciador de SV40).

Em concretizações preferidas da invenção quando colocada em prática utilizando animais transgénicos, que não humanos, tipicamente mamíferos não humanos tais como ratinhos, os animais são portadores de pelo menos uma cópia de um transgene ou uma construção de direccionamento como aqui descritos, integrada quer de forma homóloga quer não homóloga, numa localização cromossómica endógena, de modo codificar um polipéptido de APP com mutação sueca. Estes animais transgénicos são usualmente produzidos através da introdução do transgene ou da construção de direccionamento num ovo fertilizado ou num hemocitoblasto (célula ES - "*stem cell*") embrionário, tipicamente por microinjecção, electroporação, lipofecção, ou biolística. Os animais transgénicos expressam o gene de APP com mutação sueca do transgene (ou a construção de direccionamento recombinada de forma homóloga), tipicamente em tecido do cérebro. Estes animais são adequados

para utilização em vários modelos de doenças e utilizações para pesquisa de drogas, bem como para outras aplicações.

Também se descrevem aqui animais e células, que não humanos, que são portadores de pelo menos uma construção de direccionamento integrada que corrompe funcionalmente um *locus* do gene de APP endógeno, tipicamente por deleção ou mutação de um elemento genético (*e.g.*, sequência de exão, sinal de união, promotor, potenciador) que seja necessário para a expressão funcional eficiente de um produto génico completo.

São aqui também descritos animais transgénicos, que não humanos, tais como um mamífero não primata, que tenha pelo menos um alelo de APP endógeno inactivado, e preferivelmente seja homozigótico para os alelos de APP inactivados, e que seja substancialmente incapaz de dirigir a expressão eficiente de APP endógena (*i.e.*, do tipo selvagem). Por exemplo, um ratinho transgénico é homozigótico para alelos de APP endógenos inactivados e é substancialmente incapaz de produzir APP de murídeo codificada por um gene de APP endógeno (*i.e.*, de ocorrência natural). Um tal ratinho transgénico, possuindo genes de APP endógenos inactivados, é um hospedeiro receptor preferido para um transgene que codifica um polipéptido de APP heterólogo, preferivelmente um polipéptido de APP humana com mutação sueca. Por exemplo, a APP humana compreendendo a mutação sueca pode ser codificada e expressa a partir de um transgene ou transgenes heterólogos nestes ratinhos transgénicos. Estes transgenes heterólogos podem ser integrados numa localização não homóloga num cromossoma do animal que não humano, ou podem ser integrados por recombinação homóloga ou conversão génica num *locus* do gene de APP não humana, efectuando assim simultaneamente a anulação ("*knockout*") do gene de APP endógeno (ou seu segmento) e a substituição com o gene de APP humana (ou seu segmento).

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Fig. 1, painéis A e B, são mapas plasmídicos de pNSEAPPswΔ3' e pNSEAPPsw, respectivamente, que são utilizados para produzir ratinhos transgénicos como aqui se descreve.

A Fig. 2 é uma transferência de Western de fracções solúveis de cérebros de animais transgénicos e de controlo sondadas quanto à presença de

fragmentos de βAPP segregados reactivos com o anticorpo sueco 192. Pista 1: marcadores de peso molecular; pista 2: linha não transgénica; pista 3: linha transgénica.

A Fig. 3, painéis A e B, são transferências de *Western* de homogeneizados de cérebro de animais transgénicos (+) e não transgénicos (-) desprovidos de formas de βAPP reactivas com anticorpo 6C6 sondados com anticorpo 8E5 (painel A) e anticorpo sueco 192 (painel B).

A Fig. 4 apresenta uma imunotransferência que demonstra a especificidade do anticorpo sueco 192. As pistas 1, 3, 5 contêm material eluído de agarose com heparina. As pistas 2, 4, 6 contêm material eluído de resina com 6C6. As pistas 1 e 2 foram sondadas com anticorpo 8E5; As pistas 3 e 4 foram sondadas com o anticorpo sueco 192; As pistas 5 e 6 foram sondadas com anticorpo 6C6.

Definições

A menos que definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado que é vulgarmente entendido por um perito na arte a que esta invenção pertence. Embora possam ser utilizados quaisquer métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos aqui descritos na prática ou teste da presente invenção, os métodos e materiais preferidos são os descritos. No âmbito da presente invenção, os termos e expressões seguintes são abaixo definidos.

A expressão "corresponde a" é aqui utilizada para significar que uma sequência polinucleotídica é homóloga (*i.e.*, é idêntica, não estritamente relacionada de forma evolutiva) com toda ou com uma porção de uma sequência polinucleotídica de referência, ou que uma sequência polipeptídica é idêntica a uma sequência polipeptídica de referência. Em oposição, a expressão "complementar a" é aqui utilizada para significar que a sequência complementar é homóloga a toda ou a uma porção de uma sequência polinucleotídica de referência. Para ilustração, a sequência nucleotídica "TATAC" corresponde a uma sequência de referência "TATAC" e é complementar a uma sequência de referência "GTATA".

As expressões "corresponde substancialmente a", "substancialmente homólogo a" ou "com identidade substancial", tal como aqui utilizadas, referem-se a uma característica de uma sequência de ácido nucleico, em que uma sequência de ácido nucleico tem pelo menos 70 porcento de identidade de sequências em comparação com uma sequência de referência, tipicamente pelo menos 85 porcento de identidade de sequências, e preferivelmente pelo menos 95 porcento de identidade de sequências em comparação com a sequência de referência. A percentagem de identidade de sequências é calculada excluindo pequenas deleções ou adições cujo total seja inferior a 25 porcento da sequência de referência. A sequência de referência pode ser um subconjunto de uma sequência maior, tal como uma porção de um gene ou sequência flanqueadora, ou uma porção repetida de um cromossoma. Contudo, a sequência de referência tem pelo menos 18 nucleótidos de comprimento, tipicamente pelo menos 30 nucleótidos de comprimento, e preferivelmente pelo menos 50 a 100 nucleótidos de comprimento. "Substancialmente complementar", tal como aqui se utiliza, refere-se a uma sequência que é complementar a uma sequência que corresponde substancialmente a uma sequência de referência.

A hibridação específica é aqui definida como a formação de híbridos entre uma sequência de um transgene de direccionamento (*e.g.*, um polinucleótido da invenção que pode incluir substituições, deleção, e/ou adições) e uma sequência de ADN alvo específica (*e.g.*, uma sequência do gene de APP humana), em que a sequência de transgene de direccionamento marcada hibrida preferencialmente com o alvo de modo a que, por exemplo, uma única banda correspondente a um fragmento de restrição de um gene possa ser identificada numa transferência de *Southern* de ADN preparado a partir de células utilizando a referida sequência de transgene de direccionamento marcada como sonda. É evidente que as condições óptimas de hibridação variarão dependendo da composição da sequência e dos comprimentos dos transgene(s) de direccionamento e do(s) alvo(s) endógeno(s), e do método experimental seleccionado pelo operador. Podem-se utilizar várias orientações para seleccionar as condições de hibridação apropriadas (veja-se, Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1989), 2ª Ed., Cold Spring Harbor, N.Y. e Berger e Kimmel, *Methods in Enzymology*, Volume 152, *Guide to Molecular Cloning Techniques* (1987), Academic Press, Inc., San Diego, CA, que são aqui incorporados por referência.

A expressão "de ocorrência natural", tal como aqui se utiliza aplicada a um objecto, refere-se ao facto de um objecto poder ser encontrado na Natureza. Por exemplo, uma sequência polipeptídica ou polinucleotídica que está presente num organismo (incluindo vírus) que pode ser isolada de uma fonte na Natureza e que não tenha sido intencionalmente modificada pelo Homem no laboratório é de ocorrência natural. Tal como aqui se utiliza, estirpes laboratoriais de roedores que podem ser criadas selectivamente de acordo com a genética clássica são considerados animais de ocorrência natural.

O termo "cognato" tal como aqui se utiliza, refere-se a uma sequência génica que está evolutiva e funcionalmente relacionada entre espécies. Por exemplo, mas sem limitação, no genoma humano, o *locus* do gene da cadeia pesada de imunoglobulina humana é o gene cognato ao *locus* do gene da cadeia pesada de imunoglobulina de ratinho, uma vez que as sequências e as estruturas destes dois genes indicam que são altamente homólogos e ambos os genes codificam uma proteína que funciona para ligar especificamente antigénios.

Tal como aqui se utiliza, o termo "xenogénico" é definido em relação a uma célula hospedeira receptora de mamífero ou animal que não humano e significa que uma sequência de aminoácidos ou uma sequência polinucleotídica não é codificada por, ou não está presente, respectivamente, no genoma de ocorrência natural da célula hospedeira receptora de mamífero ou no animal que não humano. Sequências de ADN xenogénicas são sequências de ADN estranhas; por exemplo, um gene de APP humana é xenogénico em relação a células ES de murídeo; também, para ilustração, um alelo de CFTR associado a fibrose cística humana é xenogénico em relação a uma linha celular humana que é homozigótica para alelos de CFTR do tipo selvagem (normais). Assim, uma sequência de ácido nucleico clonada de murídeo que foi mutada (*e.g.*, por mutagénese dirigida ao local) é xenogénica em relação ao genoma de murídeo do qual a sequência foi originalmente derivada, se a sequência mutada não ocorrer naturalmente no genoma de murídeo.

Tal como aqui se utiliza, um "gene heterólogo" ou uma "sequência polinucleotídica heteróloga" define-se em relação ao organismo transgénico não humano que produz um tal produto génico. Um polipéptido heterólogo, também

referido como um polipéptido xenogeneico, é definido como um polipéptido possuindo uma sequência de aminoácidos ou uma sequência de ADN que codificante correspondente à de um gene cognato encontrado num organismo que não consiste no animal transgénico, que não humano. Assim, um ratinho transgénico portador de um gene de APP humana pode ser descrito como portador de um gene de APP heterólogo. Um transgene contendo vários segmentos do gene que codifica uma sequência de uma proteína heteróloga pode ser prontamente identificado, *e.g.* por hibridação ou sequenciação de ADN, como sendo de uma espécie de organismo que não a do animal transgénico. Por exemplo, a expressão de sequências de aminoácidos de APP humana pode ser detectada nos animais transgénicos, que não humanos, da invenção, com anticorpos específicos para epítopos de APP humana codificados por segmentos do gene da AP humana. Um gene cognato heterólogo refere-se a um gene correspondente de outra espécie; assim, se a APP de murídeo for a referência, a APP humana é um gene cognato heterólogo (tal como o é a APP porcina, ovina, ou de rato, juntamente com genes de AP de outra espécie). Uma sequência de um gene endógeno mutado pode ser referida como um gene heterólogo; por exemplo, um transgene que codifica uma APP de murídeo compreendendo a mutação sueca (que não é conhecida nos genomas de murídeo de ocorrência natural) é um transgene heterólogo em relação a espécies de murídeo e que não de murídeo.

Tal como aqui se utiliza, a expressão "construção de direccionamento" refere-se a um polinucleótido que compreende: (1) pelo menos uma região de homologia possuindo uma sequência que é substancialmente idêntica ou substancialmente complementar a uma sequência presente num *locus* de um gene endógeno da célula hospedeira, e (2) uma região de direccionamento que fica integrada num *locus* de um gene endógeno da célula hospedeira por recombinação homóloga entre uma região de homologia da construção de direccionamento e a referida sequência do *locus* de um gene endógeno. Se a construção de direccionamento for uma construção do tipo "*hit-and-run*" ou "*in-and out*" (Valancius e Smithies (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11: 1402; Donehower *et al.* (1992) *Nature* 356: 215; (1991) *J. NIH Res.* 3: 59; Hasty *et al.* (1991) *Nature* 350; 243, que são aqui incorporados por referência), a região de direccionamento é incorporada apenas de forma transiente no *locus* do gene endógeno e é eliminada do genoma do hospedeiro por selecção. Uma região de direccionamento pode compreender uma sequência que é substancialmente

homóloga a uma sequência de um gene endógeno e/ou pode compreender uma sequência não homóloga, tal como um marcador seleccionável (*e.g.*, *neo*, *tk*, *gpt*). A expressão "construção de direccionamento" não indica necessariamente que o polinucleótido compreende um gene que fica integrado no genoma do hospedeiro, nem indica necessariamente que o polinucleótido compreende uma sequência génica estrutural completa. Tal como se utiliza na arte, a expressão "construção de direccionamento" é sinónima da expressão "transgene de direccionamento " tal como aqui se utiliza.

As expressões "região de homologia" e "grampo de homologia" tal como aqui se utilizam, referem-se a um segmento (*i.e.*, uma porção) de uma construção de direccionamento possuindo uma sequência que corresponde substancialmente a, ou é substancialmente complementar a, uma sequência predeterminada de um gene endógeno, que pode incluir sequências de flanqueio do referido gene. Uma região de homologia tem geralmente pelo menos cerca de 100 nucleótidos de comprimento, preferivelmente pelo menos cerca de 250 to 500 nucleótidos de comprimento, tipicamente pelo menos cerca de 1000 nucleótidos de comprimento ou mais. Embora não haja um comprimento mínimo teórico demonstrado para um grampo de homologia para mediar recombinação homóloga, crê-se que a eficiência da recombinação homóloga geralmente aumenta com o comprimento do grampo de homologia. De forma semelhante, a eficiência da recombinação aumenta com o grau de homologia de sequências entre a região de homologia da construção de direccionamento e a sequência alvo endógena, ocorrendo a eficiência de recombinação óptima quando um grampo de homologia é isogénico da sequência alvo endógena. As expressões "grampo de homologia" e "região de homologia" são sinónimos, tal como aqui se utilizam, e a terminologia alternativa é oferecida para clarificação, tendo em conta a utilização inconsistente de termos semelhantes na arte. Um grampo de homologia não conota necessariamente formação de uma estrutura híbrida de bases emparelhadas com uma sequência endógena. As sequências génicas endógenas que substancialmente correspondem, ou são substancialmente complementares a, uma região de homologia de um transgene são aqui referidas como "sequências alvo de permutação" ou "sequências alvo endógenas."

Tal como aqui se utiliza, o termo "minigene" refere-se a uma construção de um gene heterólogo em que um ou mais segmentos não essenciais de um gene estão delecionados relativamente ao gene de ocorrência natural.

Tipicamente, os segmentos delecionados são sequências intrónicas de pelo menos cerca de 100 pares de bases a vários quilobases, e podem estender-se até várias dezenas de quilobases ou mais. O isolamento e a manipulação de grandes construções de direccionamento (*i.e.*, mais de cerca de 50 quilobases) é frequentemente difícil e pode reduzir a eficiência da transferência da construção de direccionamento para uma célula hospedeira. Assim, é frequentemente desejável reduzir o tamanho de uma construção de direccionamento através da deleção de uma ou mais porções não essenciais do gene. Tipicamente, as sequências intrónicas que não abrangem elementos reguladores essenciais podem ser delecionados. Frequentemente, se locais de restrição convenientes se ligam a uma sequência intrónica não essencial de uma sequência génica clonada, pode ser produzida uma deleção da sequência intrónica por: (1) digestão do ADN clonado com as enzimas de restrição apropriadas, (2) separação dos fragmentos de restrição (*e.g.*, por electroforese), (3) isolamento dos fragmentos de restrição que abrangem os exões e os elementos reguladores essenciais, e (4) ligação dos fragmentos de restrição isolados para formar um minigene em que os exões estão na mesma ordem linear que a presente na cópia da linha germinativa do gene de ocorrência natural. Os métodos alternativos para a produção de um minigene serão aparentes aos peritos na arte (*e.g.*, ligação de clones genómicos parciais que abrangem exões essenciais mas a que faltam porções da sequência intrónica). Mais tipicamente, os segmentos do gene que compreendem um minigene arranjar-se-ão na mesma ordem linear que a que está presente no gene da linha germinativa, contudo, não será sempre este o caso. Alguns elementos reguladores desejados (*e.g.*, potenciadores, silenciadores) podem ser relativamente insensíveis à posição, de modo que o elemento regulador funcionará correctamente mesmo se posicionado de forma diferente num minigene em relação ao gene correspondente da linha germinativa. Por exemplo, um potenciador pode estar localizado a uma distância diferente de um promotor, numa orientação diferente, e/ou numa ordem linear diferente. Por exemplo, um potenciador que está localizado a 3' de um promotor na configuração da linha germinativa pode estar localizado a 5' do promotor num minigene. De modo semelhante, alguns genes podem ter exões que estão alternativamente unidos ao nível do ARN, e assim um minigene pode ter menos exões e/ou exões numa ordem linear diferente do que no gene correspondente da linha germinativa e ainda codificar um produto génico funcional. Um ADNc que codifica um produto génico pode também ser utilizado para construir um

minigene. Contudo, uma vez que é frequentemente desejável que o minigene heterólogo seja expresso de forma semelhante ao gene cognato de ocorrência natural não humano, a transcrição de um minigene de ADNc é tipicamente conduzida por um promotor do gene ligado e um potenciador do gene de ocorrência natural. Frequentemente, um tal minigene pode compreender uma sequência reguladora da transcrição (*e.g.*, um promotor e/ou um potenciador) que confere transcrição específica de neurónios ou específica do SNC das sequências do minigene que codifica APP.

Tal como aqui se utilizam, as expressões "unidade transcricional" ou "complexo transcricional" referem-se a uma sequência polinucleotídica que compreende um gene estrutural (exões), um promotor ligado que actua em cis e outras sequências que actuam em cis necessárias para a eficiente transcrição das sequências estruturais, dos elementos reguladores distais necessários para a transcrição adequada, específica de tecidos e de desenvolvimento, das sequências estruturais, e sequências cis adicionais importantes para as eficientes transcrição e tradução (*e.g.*, local de poliadenilação, sequências de controlo da estabilidade do ARNm).

Tal como aqui se utiliza, "ligado" significa uma ligação polinucleotídica (*i.e.*, ligação fosfodiéster). "Não ligado" significa não ligado a uma outra sequência polinucleotídica; portanto, duas sequências não estão ligadas se cada sequência tem um terminal 5' livre e um terminal 3' livre.

Tal como aqui se utiliza, a expressão "operativamente ligado" refere-se a uma ligação de elementos polinucleotídicos numa relação funcional. Um ácido nucleico está "operativamente ligado" quando está colocado numa relação funcional com outra sequência de ácido nucleico. Por exemplo, um promotor ou um potenciador estão operativamente ligados a uma sequência de codificação se afectarem a transcrição da sequência de codificação. Operativamente ligado significa que as sequências de ADN ligadas são tipicamente contíguas e, quando necessário ligar duas regiões de codificação de proteínas, contíguas e em enquadramento de leitura.

Tal como aqui se utiliza, a expressão "construção correctamente direccionada" refere-se a uma porção da construção de direccionamento que está integrada no interior, ou adjacente a uma sequência alvo de permutação,

endógena, tal como uma porção de um *locus* de um gene de APP endógeno. Por exemplo, mas sem limitação, uma porção de um transgene de direccionamento que codifica *neo* e flanqueada por regiões de homologia possuindo identidade substancial com sequências do gene de APP endógenas que flanqueiam o primeiro exão, está correctamente direccionada quando a referida porção do transgene está integrada numa localização do cromossoma de modo a substituir, por exemplo, o primeiro exão do gene de APP endógeno. Em contraste e também como exemplo, se o transgene de direccionamento ou uma sua porção está integrado numa região não homóloga e/ou numa região que não a cerca de 50 kb de uma sequência do gene de APP, o produto resultante é um transgene incorrectamente direccionado. É possível gerar células possuindo tanto transgene(s) correctamente direccionado(s) como transgene(s) incorrectamente direccionado(s). Células e animais possuindo um transgene ou transgenes correctamente direccionados e/ou um transgene ou transgenes incorrectamente direccionados, podem ser identificados e resolvidos por análise de PCR e/ou de transferência de *Southern* de ADN genómico.

Tal como aqui se utiliza, a expressão "região de direccionamento" refere-se a uma porção de uma construção de direccionamento que fica integrada numa localização do cromossoma endógeno após recombinação homóloga entre um grampo de homologia e uma sequência de um gene de APP endógeno. Tipicamente, uma região de direccionamento é flanqueada de cada lado por um grampo de homologia, tal que uma recombinação de dupla permutação entre cada um dos grampos de homologia e suas correspondentes sequências endógenas do gene de APP resulta na substituição da porção do *locus* do gene de APP endógeno pela região de direccionamento; nestas construções de direccionamento de substituição de dupla permutação, a genes, a região de direccionamento pode ser referida como a "região de substituição". Contudo, algumas construções de direccionamento podem utilizar apenas um único grampo de homologia (*e.g.*, alguns vectores do tipo "*hit-and-run*", veja-se, Bradley *et al.* (1992) *Bio/Technology* 10: 534, aqui incorporado por referência).

Tal como aqui se utiliza, a expressão "região de substituição" refere-se a uma porção de uma construção de direccionamento flanqueada por regiões de homologia. Por recombinação homóloga de dupla permutação entre as regiões de homologia flanqueadoras e as suas correspondentes sequências alvo de permutação do gene de APP endógeno, a região de substituição é integrada no

cromossoma da célula hospedeira entre as sequências alvo de permutação endógenas. As regiões de substituição podem ser homólogas (*e.g.*, ter uma sequência semelhante à sequência do gene de APP endógeno mas possuindo uma mutação pontual ou uma mutação de sentido errado), não homóloga (*e.g.*, uma cassete de expressão do gene *neo*), ou uma combinação de regiões homólogas e não homólogas. A região de substituição pode converter o alelo de APP endógeno num alelo de APP compreendendo uma mutação sueca; por exemplo, a região de substituição pode estender-se na porção do gene de APP que codifica os resíduos 595 e 596 da isoforma de APP de 695 aminoácidos de comprimento (ou seus equivalentes não humanos) e a região de substituição pode compreender uma sequência que codifica asparagina^{595} -leucina^{596} nas posições 595 e 596 (de acordo com a numeração de Kang *et al.* (1987) *op.cit*).

As expressões "ruptura funcional" ou "funcionalmente corrompido", tal como aqui se utilizam, significam que o *locus* de um gene compreende pelo menos uma mutação ou alteração estrutural tal que o gene que sofreu a ruptura funcional é incapaz de dirigir a expressão eficiente do produto génico funcional. Por exemplo mas sem limitação, um gene de APP endógeno que tem uma cassete de um gene *neo* integrada num exão (*e.g.*, o terceiro exão) de um gene de APP, não é capaz de codificar uma proteína (isoforma) funcional que compreenda o exão inactivado, e é portanto um *locus* do gene de APP funcionalmente corrompido. Também como exemplo, mutação direccionada nos exões de um gene de APP endógeno pode resultar num gene endógeno mutado que pode expressar uma isoforma truncada da proteína APP. A ruptura funcional pode incluir a completa substituição de um *locus* do gene de APP heterólogo no lugar de um *locus* de APP endógeno, de modo que, por exemplo, um transgene de direccionamento que substitui todo o *locus de* APP de ratinho por um alelo de mutação sueca de APP humana, que pode ser funcional no ratinho, diz-se estar funcionalmente corrompido no *locus* de APP de murídeo endógeno através da sua substituição. Preferivelmente, pelo menos um exão que é incorporado nos ARNm que codificam a maioria ou todas as isoformas de APP sofreu ruptura funcional. A deleção ou a interrupção de elementos reguladores da transcrição essenciais, sinal ou sinais de poliadenilação, sequências de locais de união, originarão também um gene funcionalmente corrompido. A ruptura funcional de um gene de APP endógeno, pode também ser produzida por outros métodos (*e.g.*, supressão do gene polinucleotídico anti-sentido). A expressão "estruturalmente corrompido" refere-se a um gene

alvejado em que pelo menos uma sequência estrutural (*i.e.*, exão) foi alterada por direccionamento a genes homólogos (*e.g.*, por inserção, deleção, mutação ou mutações pontuais, e/ou rearranjo). Tipicamente, os alelos de APP que estão estruturalmente corrompidos estão consequentemente funcionalmente corrompidos, contudo os alelos de APP podem também ser funcionalmente corrompidos sem serem concomitantemente estruturalmente corrompidos, *i.e.*, por alteração direccionada a uma sequência que não um exão tal como ablação de um promotor. Um alelo que compreende uma alteração direccionada que interfere com a expressão eficiente de um produto génico funcional do alelo é referido na arte como um "alelo nulo" ou "alelo *knockout*".

O termo "agente" é aqui utilizado para denotar um composto químico, uma mistura de compostos químicos, uma macromolécula biológica, ou um extracto feito a partir de materiais biológicos tais como bactérias, plantas, fungos, ou células ou tecidos animais (particularmente de mamífero).

Tal como aqui se utilizam, "isoforma", "APP" e "isoforma de APP" referem-se a um polipéptido que é codificado por pelo menos um exão do gene de APP (Kitaguchi *et al.* (1988) *Nature* 331:530; Ponte *et al.*, *ibid.*, pág. 525; R.E. Tanzi, *ibid.*, pág. 528; de Sauvage e Octave (1989) *Science* 245:651; Golde *et al.* (1990) *Neuron* 4:253). Uma isoforma de APP pode ser codificada por um alelo de APP (ou um seu exão) que está associado a uma forma da doença de Alzheimer ou que não está associada a um fenótipo de doença da DA.

A expressão "gene β-amilóide" é aqui utilizada como um sinónimo de gene de APP, uma vez que β-amilóide é o produto proteico produzido por uma clivagem pós-tradução de um produto do gene de APP.

Tal como aqui se utilizam, "APP^{695}", "APP^{751}" e "APP^{770}" referem-se, respectivamente, aos polipéptidos de 695, 751 e 770 resíduos de aminoácido de comprimento codificados pelo gene de APP humana (Ponte *et al. loc. cit.*; Kitaguchi *et al. loc. cit.*; Tanzi *et al. loc. cit.*).

Tal como aqui se utilizam, "codão 595" e "codão 596" referem-se aos codãos (*i.e.*, as sequências trinucleotídicas) que codificam as 595ª e 596ª posições de aminoácidos em APP^{695}, ou a posições de aminoácidos numa

isoforma ou fragmento de APP que correspondem às posições 595ª e 596ª em APP^{695} de acordo com a numeração convencional em kang *et al.* (1987) *op. cit*). Por exemplo, mas sem limitação, um fragmento de 600 resíduos de comprimento que é produzido por truncagem de APP^{695} por remoção dos 95 aminoácidos do terminal N tem as suas posições de aminoácidos 500ª e 501ª correspondentes aos codões 595 e 596 de APP^{695}. De facto, tal como aqui se utiliza, a mutação sueca é caracterizada por ter os resíduos asparagina e leucina, respectivamente, nas posições de aminoácidos 595 e 596 em APP^{695} que correspondem às posições de aminoácidos 670 e 671 em APP^{770}.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Genericamente, a nomenclatura aqui utilizada seguidamente e os procedimentos laboratoriais em cultura de células, genética molecular, e química de ácido nucleico e hibridação adiante descritos são os bem conhecidos e normalmente empregues na arte. São utilizadas técnicas *standard* para os métodos de recombinação de ácido nucleico, síntese de polinucleótidos, cultura de células, e incorporação de transgenes (*e.g.*, electroporação, microinjecção, lipofecção). Genericamente, as reacções enzimáticas, a síntese de oligonucleótidos, e os passos de purificação são realizados de acordo com as especificações dos fabricantes. As técnicas e procedimentos são genericamente realizados de acordo com métodos convencionais na arte e com várias referências genéricas que são proporcionadas ao longo deste documento. Crê-se que esses procedimentos são bem conhecidos na arte e são proporcionados para conveniência do leitor. Toda a informação aí contida é aqui incorporada por referência.

Os ratinhos quiméricos direccionados são derivados de acordo com Hogan, *et al.*, *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) e *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E.J. Robertson, ed., IRL Press, Washington, D.C., (1987) que são aqui incorporados por referência.

Os hemocitoblastos embrionários são manipulados de acordo com procedimentos publicados (*Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E.J. Robertson, ed., IRL Press, Washington, D.C. (1987); Zjilstra *et al.*, *Nature* 342:435-438 (1989); e Schwartzberg *et al.*, *Science* 246:799-803 (1989), todos aqui incorporados por referência).

Os oligonucleótidos podem ser sintetizados num sintetizador de oligonucleótidos da Applied Bio Systems de acordo com as especificações proporcionadas pelo fabricante.

Em geral, seguidamente descrevem-se métodos e construções polinucleotídicas que são empregues para gerar animais transgénicos, que não humanos, que expressam um polipéptido de APP compreendendo a mutação sueca. Alguns animais transgénicos, que não humanos, que expressam uma APP com mutação sueca podem ter também o *locus* do gene de APP endógeno funcionalmente corrompido. Com vantagem, a mutação sueca resulta na expressão aumentada de Aβ, com animais ou células que expressam geralmente Aβ com mutação sueca codificada por transgenes a um nível significativamente mais elevado do que a Aβ normal. Crê-se que Met^{596} para Leu^{596} tem particular importância na expressão preferencial da Aβ sueca em comparação com a Aβ normal (tipo selvagem).

Os fragmentos segregados recentemente identificados compreendem a porção amino-terminal de βAPP (Aβ) que permanece após clivagem e serão referidos posteriormente como a forma de fragmento amino-terminal de βAPP (ATF-βAPP). Crê-se que a ATF-βAPP é o produto de uma via de processamento secretor alternativa para Aβ, via esta que está presente mesmo em células normais (não doentes). Crê-se ainda, contudo, que a via secretora alternativa pode ser responsável por um evento essencial na produção de Aβ em células doentes em pacientes, e que a produção anormal de ATF-βAPP pode estar envolvida em doenças relacionadas com a placa de Aβ, particularmente a doença de Alzheimer e o síndrome de Down.

Os modelos animais particularmente preferidos para a clivagem de Aβ com β-secretase são animais transgénicos que expressam a mutação sueca do gene de Aβ, tal como descrito acima. Verificou-se que estes animais transgénicos, particularmente ratinhos transgénicos, produzem elevadas quantidades de ATF-βAPP que se podem detectar de acordo com os métodos da presente invenção. Em particular, verificou-se que a mutação sueca de Aβ produz quantidades de ATF-βAPP que serão normalmente pelo menos duas vezes mais elevadas do que as da βAPP humana do tipo selvagem expressa em

animais. Normalmente, a produção será significativamente mais elevada, sendo tipicamente pelo menos duas vezes mais elevada. Com níveis assim elevados de produção de ATF-βAPP, a monitorização da actividade de β-secretase sob diferentes condições é grandemente facilitada. Em particular, a pesquisa de drogas e outras terapias para inibição da actividade de β-secretase (e assim a inibição da produção de βAPP) são grandemente simplificadas em modelos animais que expressam a mutação sueca de βAPP humana.

Os agentes são administrados a animais de teste, tais como ratinhos de teste, que são transgénicos e que expressam a mutação sueca de βAPP humana. São descritas em seguida técnicas particulares para a produção de ratinhos transgénicos que expressam a forma sueca de βAPP. Notar-se-á que a preparação de outros animais transgénicos que expressam a βAPP humana sueca pode ser facilmente conseguida, incluindo ratos, *hamsters*, porquinhos-da-índia, coelhos, e semelhantes. O efeito dos compostos de teste sobra a produção de ATF-βAPP em animais de teste pode ser medido em vários espécimes do animais de teste.

O efeito de agentes de teste sobre a produção de ATF-βAPP em animais de teste pode ser medido em vários espécimes dos animais de teste. Em todos os casos, será necessário obter um valor de controlo que seja característico do nível de produção de ATF-βAPP no animal de teste na ausência do(s) composto(s) de teste. Nos casos em que o animal é sacrificado, será necessário basear esses valores de controlo num valor médio ou típico a partir de outros animais de teste que tenham sido transgenicamente modificados para expressar o mutante sueco de βAPP humana mas que não tenham recebido a administração de quaisquer compostos de teste ou quaisquer outras substâncias que se espere afectarem o nível de produção de ATF-βAPP. Uma vez determinado esse nível de controlo, os compostos de teste podem ser administrados a animais de teste adicionais, onde o desvio ao valor médio de controlo indica que o composto de teste tem efeito sobre a actividade de β-secretase no animal. As substâncias de teste que são consideradas positivas, *i.e.*, provavelmente benéficas no tratamento da doença de Alzheimer ou outras condições relacionadas com β-amilóide, serão aquelas que são capazes de reduzir o nível de produção de ATF-βAPP, preferivelmente em pelo menos 20%,

mais preferivelmente em pelo menos 50%, e mais preferivelmente em pelo menos 80%.

Os agentes de teste podem ser qualquer molécula, composto, ou outra substância que pode ser adicionada à cultura de células ou administrada ao animal de teste sem interferir substancialmente com a viabilidade da célula ou do animal. Os agentes de teste adequados podem ser pequenas moléculas, polímeros biológicos, tais como polipéptidos, polissacáridos, polinucleótidos, e semelhantes. Os compostos de teste serão tipicamente administrados a animais transgénicos numa dosagem de 1 ng/kg a 10 mg/kg, usualmente de 10 μg/kg a 1 mg/kg.

Os compostos de teste que são capazes de inibir a secreção ou a produção de ATFβAPP no animal são considerados como candidatos para determinações adicionais da capacidade para bloquear a produção β-amilóide em animais e humanos. A inibição da secreção ou da produção indica que provavelmente a clivagem de βAPP no terminal amino de βAP foi pelo menos parcialmente bloqueada, reduzindo a quantidade de um intermediário de processamento disponível para conversão em péptido β-amilóide.

A presente invenção proporciona composições farmacêuticas que incorporam um composto seleccionado pelo método acima descrito e incluindo um transportador farmaceuticamente aceitável. Estas composições farmacêuticas deverão conter uma quantidade terapêutica ou profilática de pelo menos um composto identificado pelo método acima descrito. O transportador farmaceuticamente aceitável pode ser qualquer substância não tóxica, compatível, adequada para entregar os compostos a um hospedeiro pretendido. Água estéril, álcool, gorduras, ceras e sólidos inertes, podem ser utilizados como transportador. Podem ser também incorporados nas composições farmacêuticas, adjuvantes, agentes tamponantes, agentes de dispersão, e semelhantes, farmaceuticamente aceitáveis. A preparação de composições farmacêuticas que incorporam agentes activos estão bem descritas na literatura médica e científica. Veja-se, por exemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 16ª Ed., 1982.

As composições farmacêuticas descritas são adequadas para administração sistémica ao hospedeiro, incluindo administração parentérica,

tópica e oral. As composições farmacêuticas podem ser administradas parentericamente, *i.e.*, por via subcutânea, intramuscular ou intravenosa. Assim, a presente invenção proporciona composições para administração a um hospedeiro, onde as composições compreendem uma solução farmaceuticamente aceitável do composto identificado num transportador aceitável, como acima descrito.

Transgenes que codificam proteína APP heteróloga com mutação sueca

Numa concretização preferida, um transgene que codifica uma proteína APP heteróloga compreendendo a mutação sueca (asparagina^{595}-leucina^{596}) é transferido para um embrião fertilizado ou uma célula ES, para produzir um animal transgénico, que não humano, que expresse polipéptido(s) de APP compreendendo a mutação sueca. Um transgene que codifica uma proteína APP heteróloga com mutação sueca compreende sequências estruturais que codificam uma proteína APP heteróloga com mutação sueca, e geralmente também compreende elementos reguladores ligados que conduzem a expressão da proteína APP heteróloga com mutação sueca no hospedeiro que não humano. Contudo, os elementos reguladores endógenos no genoma do hospedeiro não humano podem ser explorados por integração de sequências de transgenes numa localização do cromossoma contendo elementos reguladores endógenos funcionais que são adequados para a expressão das sequências estruturais heterólogas. Uma tal integração direccionada é usualmente realizada por direccionamento a genes homólogos como acima descrito, em que o transgene heterólogo compreenderia pelo menos um grampo de homologia.

Quando um transgene heterólogo se baseia nos seus próprios elementos reguladores, são incluídos elementos de transcrição e sequência(s) de poliadenilação adequados. Pelo menos um promotor é ligado a montante da primeira sequência estrutural numa orientação para conduzir a transcrição das sequências estruturais heterólogas. Por vezes é utilizado o promotor do gene de ocorrência natural heterólogo (*e.g.*, é utilizado um promotor de APP humana para conduzir a expressão de um transgene de APP humana com mutação sueca). Alternativamente, o promotor do gene de APP endógeno cognato pode ser utilizado (*e.g.*, o promotor de APP de murídeo é utilizado para conduzir a expressão de um transgene de APP humana com mutação sueca). Alternativamente, pode ser utilizado um elemento regulador da transcrição heterogéneo tanto relativamente ao transgene que codifica as sequências como

ao animal hospedeiro não humano, (*e.g.*, um promotor e/ou potenciador de rato operativamente ligado a uma sequência nucleotídica que codifica APP humana com mutação sueca, em que o transgene é introduzido em ratinhos).

Em algumas concretizações, é preferível que as sequências do transgene que codificam a mutação sueca do polipéptido de APP estejam sob o controlo transcricional de promotores e/ou potenciadores (e/ou silenciadores) que não estejam operativamente ligados nos genes de APP de ocorrência natural (i.*e.*, promotores e/ou potenciadores que não de APP). Por exemplo, algumas concretizações empregarão sequências reguladoras da transcrição que conferem um elevado nível de expressão e/ou num padrão de expressão específico do tipo de célula (*e.g.*, um promotor específico de neurónios). O promotor de rato de enolase específico de neurónios (NSE) (Forss-Petter (1990) *Neuron* 5; 187) é um elemento regulador da transcrição preferido para a ligação operativa a uma sequência nucleotídica que codifica um polipéptido de APP com mutação sueca. Outros promotores e/ou potenciadores que conferem a expressão eficiente à sequência de APP codificada por transgenes em tecido de cérebro são geralmente preferidos.

Vários promotores possuindo diferentes forças (*e.g.*, *pgk*, *tk*, *dhfr*) podem ser substituídos à discrição do operador, contudo, é essencial que o promotor funcione no hospedeiro não humano e é desejável em algumas concretizações que o promotor conduza a expressão num padrão de desenvolvimento ou num padrão específico do tipo de célula (e a níveis de expressão) semelhantes a um gene de APP de ocorrência natural num hospedeiro animal em paralelo a que falta o transgene.

Um transgene heterólogo codifica geralmente pelo menos uma isoforma de APP de comprimento completo (*e.g.*, uma isoforma de 695aa). O transgene heterólogo pode compreender um polinucleótido que se estende por todo o gene de APP genómico ou uma sua porção, pode compreender um minigene, pode compreender um único segmento de codificação contíguo (*e.g.*, ADNc), ou pode compreender uma sua combinação. Frequentemente, o transgene codifica uma sequência polipeptídica de APP humana compreendendo a mutação sueca, contudo, transgenes que codificam polipéptidos de APP não humana compreendendo a mutação sueca também podem ser utilizados. Geralmente, o transgene codificará uma isoforma de APP de ocorrência natural de

comprimento completo (*e.g.*, APP^{695}, APP^{751} ou APP^{770}) compreendendo ainda a mutação sueca.

Os transgenes que codificam polipéptidos de APP compreendendo a mutação sueca compreenderão também frequentemente um ou mais marcadores seleccionáveis ligados (*infra*).

Os transgenes que codificam polipéptidos de APP heterólogos compreendendo moléculas com a mutação sueca podem ser transferidos para o genoma do hospedeiro não humano de diversas maneiras. Um transgene heterólogo pode ser direccionado para uma localização específica e predeterminada no cromossoma por direccionamento homólogo, tal como acima descrito para o direccionamento a genes. Os transgenes heterólogos podem ser transferidos para o genoma de um hospedeiro em pedaços, por direccionamento homólogo sequencial, para reconstituir um gene heterólogo completo numa localização no cromossoma do hospedeiro endógeno. Em oposição, um transgene heterólogo pode ser integrado de forma aleatória em separado ou sem utilização de uma construção de direccionamento de um gene de APP. Um transgene heterólogo pode ser co-transferido com uma construção de direccionamento de um gene de APP e, se desejado, seleccionado com um marcador separado, distinguível, seleccionável e/ou pesquisado por PCR ou análise de transferência de *Southern* de células seleccionadas. Alternativamente, pode-se introduzir um transgene heterólogo em células ES antes ou subsequentemente à introdução de uma construção de direccionamento de um gene de APP e sua selecção. Mais convenientemente, é introduzido um transgene heterólogo na linha germinativa de um animal que não humano por integração não homóloga do transgene através de injecção pronuclear, e as linhas transgénicas resultantes são criadas numa base *"knockout"* homozigótica possuindo o gene de APP endógeno cognato funcionalmente corrompido. Também podem ser criados ratinhos *"knockout"* homozigóticos e o transgene de APP heterólogo com a mutação sueca introduzido em embriões de ratinhos *"knockout"* directamente por injecção pronuclear *standard* ou outros meios conhecidos na arte.

Direccionamento a genes

Os alelos de APP não humana endógenos podem ser funcionalmente corrompidos de modo a que a expressão de APP codificada endogenamente seja

suprimida ou eliminada, de modo a não interferir nem contaminar a APP codificada por transgenes compreendendo a mutação sueca. Numa variação, um alelo de APP endógeno é convertido de modo a comprcender a mutação sueca por direccionamento a genes homólogos.

O direccionamento a genes, que é um método de utilização de recombinação homóloga para modificar o genoma de um mamífero, pode ser utilizado para introduzir alterações em células de cultura. Direccionando a um gene de interesse em hemocitoblasto embrionários (células ES), estas alterações podem ser introduzidas nas linhas germinativas de animais de laboratório para estudar os efeitos das modificações em organismos completos, entre outras utilizações. O procedimento de direccionamento a genes é realizado por introdução em células de cultura de tecidos, de uma construção de direccionamento de ADN que tem um segmento homólogo a uma *locus* alvo e que também compreende uma modificação da sequência pretendida (*e.g.*, inserção, deleção, mutação pontual). As células tratadas são então pesquisadas quanto a direccionamento correcto para identificar e isolar aquelas que foram correctamente direccionadas. Um esquema comum para a ruptura da função de um gene por direccionamento a genes em células ES consiste em construir uma construção de direccionamento que é desenhada para sofrer uma recombinação homóloga com a sua contrapartida cromossómica no genoma da célula ES. As construções de direccionamento são tipicamente arranjadas de modo a inserirem sequências adicionais, tais como um marcador de selecção positiva, em elementos de codificação do gene alvo, corrompendo-o assim funcionalmente. As construções de direccionamento são normalmente construções do tipo inserção ou do tipo substituição (Hasty *et al.* (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11: 4509).

Direccionamento a genes de APP endógenos

Podem-se produzir animais que não humanos (*e.g.*, mamíferos não primatas) que possuem o gene de APP endógeno inactivado por direccionamento a genes com uma construção de direccionamento de recombinação homóloga, através do seguinte método geral. Tipicamente, utiliza-se uma sequência do gene de APP não humana como base para a produção de iniciadores de PCR que flanqueiam uma região que será utilizada como um grampo de homologia numa construção de direccionamento. Os iniciadores de PCR são então utilizados para amplificar, por amplificação por

PCR de alta fidelidade (Mattila *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.* 19: 4967; Eckert, K.A. e Kunkel, T.A. (1991) *PCR Methods and Applications* 1: 17; Pat. dos EUA No. 4 683 202), uma sequência genómica de uma biblioteca de clones genómicos ou de uma preparação de ADN genómico, preferivelmente a partir da estirpe do animal que não humano que se pretende atingir com a construção de direccionamento. O ADN amplificado é então utilizado como um grampo de homologia e/ou região de direccionamento. Assim, os grampos de homologia para o direccionamento a um gene de APP não humana podem ser prontamente produzidos com base na informação sobre a sequência nucleotídica disponível na arte e/ou por clonagem de rotina. Os princípios gerais relativos à construção de construções de direccionamento e métodos de selecção são revistos em Bradley *et al.* (1992) *Bio/Technology* 10: 534.

Os genes de APP não humana endógenos podem ser funcionalmente corrompidos e, opcionalmente, podem ser substituídos por transgenes que codificam APP compreendendo a mutação sueca.

As construções de direccionamentos podem ser transferidas para hemocitoblastos pluripotentes, tais como hemocitoblastos embrionários de murídeo, onde as construções de direccionamento se recombinam de modo homólogo com uma porção de um *locus* do gene de APP endógeno e criam uma mutação ou mutações (*i.e.*, inserções, deleções, rearranjos, substituições de sequências e/ou mutações pontuais) que evitam a expressão funcional do gene de APP endógeno.

Um método preferido consiste na deleção, por recombinação homóloga direccionada, de elementos estruturais essenciais do gene de APP endógeno. Por exemplo, uma construção de direccionamento pode recombinar-se de modo homólogo com um gene de APP endógeno e efectuar a deleção de uma porção que se estende por substancialmente todos de um ou mais dos exões para criar um alelo desprovido de exões, tipicamente por inserção de uma região de substituição a que falta(m) o(s) exão(ões) correspondente(s). Os animais transgénicos homozigóticos para o alelo desprovido de exões (*e.g.*, criando heterozigotos uns com os outros) produzem células que são essencialmente incapazes de expressar um polipéptido de APP endógeno funcional (preferivelmente incapazes de expressar qualquer das isoformas de ocorrência natural). De modo semelhante, o direccionamento a genes homólogos pode ser

utilizado, se desejado, para corromper funcionalmente um gene de APP através da deleção de apenas uma porção de um exão.

As construções de direccionamento podem também ser utilizadas para efectuar a deleção de elementos reguladores essenciais de um gene de APP endógeno, tais como promotores, potenciadores, locais de união, locais de poliadenilação, e outras sequências reguladoras, incluindo sequências que actuam em cis, que ocorrem a montante ou a jusante do gene estrutural de APP mas que participam na expressão do gene de APP endógeno. A deleção de elementos reguladores é tipicamente realizada por inserção, por recombinação homóloga de dupla permutação, de uma região de substituição a que falta(m) o(s) correspondente(s) elemento(s) regulador(es).

Um método alternativo preferido consiste em interromper elementos estruturais e/ou reguladores essenciais de um gene de APP endógeno através de inserção direccionada de uma sequência polinucleotídica, e assim corromper funcionalmente o gene de APP endógeno. Por exemplo, uma construção de direccionamento pode recombinar-se de modo homólogo com um gene de APP endógeno e inserir uma sequência não homóloga, tal como uma cassete de expressão de *neo*, num elemento estrutural (*e.g.*, um exão) e/ou elemento regulador (*e.g.*, potenciador, promotor, local de união, local de poliadenilação) para obter um alelo de APP a que foi direccionado possuindo uma interrupção por inserção. A sequência inserida pode variar, em tamanho, de cerca de 1 nucleótido (*e.g.*, para produzir um desvio de enquadramento na sequência de um exão) até várias quilobases ou mais, tal como limitado pela eficiência do direccionamento a genes homólogos com construções de direccionamento possuindo uma longa região de substituição não homóloga.

As construções de direccionamento podem também ser empregues para substituir uma porção de um gene de APP endógeno por uma sequência exógena (*i.e.*, uma porção de um transgene de direccionamento); por exemplo, o primeiro exão de um gene de APP pode ser substituído por uma porção substancialmente idêntica que contém uma mutação sem sentido ou de sentido errado.

A inactivação de um *locus* de APP endógeno de ratinho é realizada por ruptura direccionada do gene apropriado por recombinação homóloga em

hemocitoblastos embrionários de ratinho. Para a inactivação, pode ser empregue qualquer construção de direccionamento que produza uma alteração genética no *locus* do gene de APP alvo que resulte na prevenção de expressão eficaz de um produto génico funcional desse *locus*. Se apenas elementos reguladores forem alvejados, poderá ocorrer alguma expressão de baixo nível do gene alvejado (*i.e.*, o alelo alvejado é "permeável"), contudo o nível de expressão pode ser suficientemente baixo para que o alelo alvejado permeável seja funcionalmente corrompido.

Produção de alelos de APP nulos e ratinhos *"knockout"*

Um gene de APP endógeno num hospedeiro não humano pode ser funcionalmente corrompido por recombinação homóloga com uma construção de direccionamento que não compreende um segmento de um gene de APP heterólogo cognato compreendendo a mutação sueca. Com este procedimento, uma porção da construção de direccionamento integra-se num elemento estrutural ou regulador essencial do *locus* do gene de APP endógeno, e assim corrompe-o funcionalmente para gerar um alelo nulo. Tipicamente, alelos nulos são produzidos por integração de uma sequência não homóloga que codifica um marcador seleccionável (*e.g.*, uma cassete de expressão do gene *neo*) numa sequência estrutural e/ou reguladora essencial de um gene de APP por recombinação homóloga dos grampos de homologia da construção de direccionamento com sequências do gene de APP endógeno, embora possam ser empregues outras estratégias (veja-se, *infra*).

Mais usualmente, uma construção de direccionamento é transferida por electroporação ou microinjecção para uma linha de hemocitoblastos (células ES) embrionários totipotentes, tais como as linhas AB-1 ou CCE de murídeo. A construção de direccionamento recombina-se de modo homólogo com sequências endógenas no interior, ou que flanqueiam um *locus* do gene de APP e corrompem funcionalmente pelo menos um alelo do gene de APP. Tipicamente, a recombinação homóloga da construção de direccionamento com sequências de *locus* de APP endógenos resulta na integração de uma sequência não homóloga que codifica e expressa um marcador seleccionável, tal como *neo*, normalmente na forma de uma cassete de selecção positiva (*infra*). O alelo funcionalmente corrompido é denominado um alelo de APP nulo. As células ES possuindo pelo menos um alelo de APP nulo são seleccionados fazendo a propagação das células num meio que permita a propagação preferencial de

células que expressam o marcador seleccionável. As células ES seleccionadas são examinadas por análise de PCR e/ou análise de transferência de *Southern* para verificar a presença de um alelo de APP correctamente alvejado. A criação de animais que não humanos que são heterozigóticos para um alelo nulo pode ser realizada para produzir animais que não humanos homozigóticos para o referido alelo nulo, denominados animais "*knockout*" (Donehower *et al.* (1992) *Nature* 256: 215; *Science* 256: 1392). Alternativamente, podem-se produzir células ES homozigóticas para um alelo nulo possuindo um marcador seleccionável integrado, em cultura, através de selecção num meio contendo níveis elevados do agente de selecção (*e.g.*, G418 ou higromicina). A heterozigocidade e/ou a homozigocidade para um alelo nulo correctamente direccionado pode ser verificada por análise de PCR e/ou análise de transferência de *Southern* de ADN isolado de uma alíquota de um clone de células ES seleccionadas e/ou de biópsias da cauda.

Se desejado, um transgene que codifica um polipéptido de APP heterólogo compreendendo a mutação sueca pode ser transferido para um hospedeiro não humano possuindo um alelo de APP nulo, preferivelmente para uma célula ES não humana que seja homozigótica para o alelo de APP nulo. Geralmente, é vantajoso que o transgene compreenda um promotor e um potenciador que conduzam a expressão de sequências estruturais que codificam um produto funcional de um gene heterólogo de APP com a mutação sueca. Assim, como exemplo e não como limitação, um ratinho "*knockout*" homozigótico para alelos nulos no *locus* de APP é preferivelmente um hospedeiro para um transgene que codifica e expressa uma proteína APP humana funcional compreendendo a mutação sueca. Os transgenes de APP com a mutação sueca compreendem sequências heterólogas estruturais de APP que codificam polipéptidos de APP compreendendo a mutação sueca, quer na forma de exões possuindo sequências de junção de união, como um segmento de codificação contíguo (*e.g.*, um ADNc), quer na forma de uma combinação destes. Mais usualmente, os transgenes de APP com a mutação sueca codificam polipéptidos de APP de comprimento completo, embora os transgenes possam codificar isoformas truncadas de APP, polipéptidos de APP quiméricos (*e.g.*, parte humano/parte de ratinho), e/ou variantes de APP substituídas no amino (*i.e.*, muteínas) compreendendo ainda a mutação sueca. Tipicamente, os transgenes também compreendem elementos reguladores, tais como um promotor e, para a expressão óptima, um potenciador.

Substituição de genes de APP homólogos

Alternativamente, um gene de APP endógeno num hospedeiro não humano pode ser funcionalmente corrompido por integração homóloga de um gene de APP heterólogo cognato compreendendo a mutação sueca, de um modo tal que o gene de APP heterólogo cognato substitui substancialmente o gene de APP endógeno, que se estende pelo menos nas posições de aminoácidos 595-596 de acordo com a convenção de numeração de Kang *et al.* (1987) *op.tic*, e preferivelmente substitui completamente as sequências de codificação do gene de APP endógeno. Preferivelmente, o gene de APP heterólogo com a mutação sueca está ligado, em consequência da integração homóloga, a sequências reguladoras (*e.g.*, um potenciador) do gene de APP endógeno de modo que o gene heterólogo com a mutação sueca é expresso sob o controlo transcricional de elementos reguladores do *locus* do gene de APP endógeno. Hospedeiros não humanos que são homozigóticos para estes alelos de substituição (*i.e.*, um *locus* de APP cromossómico do hospedeiro que codifica um produto do gene de APP heterólogo cognato com a mutação sueca) podem ser produzidos de acordo com métodos aqui descritos. Estes hospedeiros homozigóticos não humanos expressarão geralmente uma proteína APP heteróloga com a mutação sueca mas não expressam a proteína APP endógena. Mais usualmente, o padrão de expressão do gene de APP heterólogo com a mutação sueca imitará substancialmente o padrão de expressão do gene de APP endógeno no hospedeiro não humano de ocorrência natural (não transgénico). Como exemplo, mas sem limitação, um ratinho transgénico possuindo sequências do gene de APP humana com a mutação sueca a substituir as sequências do gene de APP endógeno de murídeo e que são transcricionalmente controladas por sequências reguladoras endógenas de murídeo serão geralmente expressas de modo semelhante à APP de murídeo em ratinhos de ocorrência natural não transgénicos.

Geralmente, emprega-se uma construção de direccionamento do tipo de substituição para substituição do gene homólogo. A recombinação homóloga de dupla permutação entre sequências do gene de APP endógeno e os grampos de homologia que flanqueiam a região de substituição (*i.e.*, a região que codifica a APP heteróloga com a mutação sueca) da construção de direccionamento resulta na integração direccionada dos segmentos do gene de APP heterólogo com a mutação sueca. Usualmente, os grampos de homologia do transgene compreendem sequências que flanqueiam os segmentos do gene de APP

endógeno, de modo que a recombinação homóloga resulta na deleção concomitante dos segmentos do gene de APP endógeno e na integração homóloga dos segmentos do gene heterólogo. Um gene de APP endógeno substancialmente completo pode ser substituído por um gene de APP heterólogo compreendendo a mutação sueca através de um único evento de direccionamento ou através de múltiplos eventos de direccionamento (*e.g.*, a substituição sequencial de exões individuais). Um ou mais marcadores seleccionáveis, usualmente na forma de cassetes de expressão de selecção positiva ou negativa, podem ser posicionados na região de substituição da construção de direccionamento; é usualmente preferido que os marcadores seleccionáveis estejam localizados em regiões de intrões da região de substituição heteróloga.

As células ES portadoras de um gene de APP heterólogo com a mutação sueca, tal como um alelo de substituição, podem ser seleccionadas de várias maneiras. Primeiro, pode-se ligar um marcador seleccionável (*e.g.*, *neo*, *gpt*, *tk*) ao gene de APP heterólogo com a mutação sueca (*e.g.*, numa sequência de intrão ou flanqueadora) na construção de direccionamento de modo que as células que possuem um alelo de substituição podem ser seleccionadas. Mais usualmente, uma construção de direccionamento do gene de APP heterólogo compreenderá tanto uma cassete de expressão de selecção positiva como uma cassete de expressão de selecção negativa, de modo que as células alvejadas de modo homólogo podem ser seleccionadas com um esquema de selecção positiva-negativa (Mansour *et al.* (1988) *op.cit.*). Geralmente, uma cassete de expressão de selecção positiva está posicionada numa região de intrão da região de substituição do gene de APP heterólogo com a mutação sueca, enquanto a cassete de expressão de selecção negativa está posicionada distal a um grampo de homologia, de modo que a recombinação homóloga de dupla permutação resultará na integração da cassete de selecção positiva e na perda da cassete de selecção negativa.

Construcões de direccionamento

Foram descritas várias técnicas de direccionamento a genes incluindo, mas não se lhes limitando: co-electroporação, "*hit-and-run*", integração de permutação simples, e recombinação de dupla permutação (Bradley *et al.* (1992) *Bio/Technology* 10: 534). A invenção pode ser colocada em prática utilizando essencialmente qualquer estratégia de direccionamento a genes

homólogos aplicável conhecida na arte. A configuração de uma construção de direccionamento depende da técnica de direccionamento específica escolhida. Por exemplo, uma construção de direccionamento para integração de permutação simples ou direccionamento "*hit-and-run*" apenas necessita de ter um único grampo de homologia ligado à região de direccionamento, enquanto que uma construção de direccionamento do tipo de substituição de dupla permutação requer dois grampos de homologia, um flanqueando cada lado da região de substituição.

Como exemplo, mas sem limitação, uma construção de direccionamento preferida compreende, por ordem: (1) um primeiro grampo de homologia possuindo uma sequência substancialmente idêntica a uma sequência em cerca de 3 quilobases a montante (*i.e.*, no sentido oposto ao enquadramento de leitura para tradução dos exões) de um exão de um gene de APP endógeno, (2) uma região de substituição compreendendo uma cassete de selecção positiva possuindo um promotor de *pgk* que conduz a transcrição de um gene *neo*, (3) um segundo grampo de homologia possuindo uma sequência substancialmente idêntica a uma sequência em cerca de 3 quilobases a jusante do referido exão do referido gene de APP endógeno, e (4) uma cassete de selecção negativa, compreendendo um promotor de *tk* de HSV que conduz a transcrição de um gene *tk* de HSV. Uma tal construção de direccionamento é adequada para recombinação de substituição de dupla permutação que efectua a deleção de uma porção do *locus* de APP endógeno que se estende do referido exão e substitui-a pela região de substituição possuindo a cassete de selecção positiva. Se o exão que sofreu deleção for essencial para a expressão do produto de um gene de APP funcional, o alelo resultante desprovido de exões está funcionalmente corrompido e é denominado um alelo nulo.

As construções de direccionamento úteis para a prática da invenção podem compreender pelo menos um grampo de homologia de APP ligado por ligação polinucleotídica (*i.e.*, por ligações fosfodiéster) a uma região de direccionamento. Um grampo de homologia tem uma sequência que corresponde substancialmente a, ou é substancialmente complementar a, uma sequência de um gene de APP endógeno de um hospedeiro animal que não humano, e pode compreender sequências flanqueando o gene de APP.

Embora não tenham sido conclusivamente determinadas na arte fronteiras inferior ou superior para grampos de homologia recombinogénicos para dirccionamento a genes, crê-se que o melhor modo para grampos de homologia está na gama entre cerca de 50 pares de bases e várias dezenas de quilobases. Consequentemente, as construções de direccionamento têm geralmente pelo menos cerca de 50 a 100 nucleótidos de comprimento, preferivelmente pelo menos cerca de 250 a 500 nucleótidos de comprimento, mais preferivelmente pelo menos cerca de 1000 a 2000 nucleótidos de comprimento, ou maiores. As regiões de homologia das construções (grampos de homologia) têm geralmente pelo menos cerca de 50 a 100 bases de comprimento, preferivelmente pelo menos cerca de 100 a 500 bases de comprimento, e mais preferivelmente pelo menos cerca de 750 a 2000 bases de comprimento. Crê-se que regiões de homologia de cerca de 7 a 8 quilobases de comprimento são preferidas, possuindo uma concretização preferida uma primeira região de homologia de cerca de 7 quilobases flanqueando um lado de uma região de substituição e uma segunda região de homologia de cerca de 1 quilobase flanqueando o outro lado da referida região de substituição. O comprimento de homologia (*i.e.*, identidade substancial) para uma região de homologia pode ser seleccionado à discrição do operador com base na composição da sequência e na complexidade da(s) sequência(s) do gene de APP endógeno alvo e nas orientações proporcionadas na arte (Hasty *et al.* (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11: 5586; Shulman *et al.* (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10: 4466). As construções de direccionamento têm pelo menos uma região de homologia possuindo uma sequência que corresponde substancialmente a, ou é substancialmente complementar a, uma sequência do gene de APP endógeno (*e.g.*, uma sequência de exão, um potenciador, um promotor, uma sequência intrónica, ou uma sequência flanqueadora a cerca de 3-20 kb de um gene de APP). Uma tal região de homologia de um transgene de direccionamento serve como molde para o emparelhamento e a recombinação homólogos com sequência(s) substancialmente idêntica(s) do gene de APP endógeno. Em construções de direccionamento, estas regiões de homologia tipicamente flanqueiam a região de substituição, que é a região da construção de direccionamento que vai sofrer substituição pela sequência do gene de APP endógeno alvejado (Berinstein *et al.* (1992) *Mol. Cell. Biol.* 12: 360). Assim, um segmento da construção de direccionamento flanqueado por regiões de homologia pode substituir um segmento da sequência de um gene de APP endógeno por recombinação homóloga de dupla permutação. As regiões de

homologia e as regiões de direccionamento estão ligadas uma à outra por ligação polinucleotídica linear convencional (esqueleto de fosfodiéster 5' para 3'). As construções de direccionamento são geralmente moléculas de ADN de cadeia dupla, mais usualmente lineares.

Sem desejar ficar ligados a qualquer teoria em particular de recombinação homóloga ou de conversão de genes, crê-se que nesta recombinação de substituição de dupla permutação, uma primeira recombinação homóloga (*e.g.*, permuta de cadeias, emparelhamento de cadeias, cisão de cadeias, ligação de cadeias) entre uma primeira região de homologia da construção de direccionamento e uma primeira sequência do gene de APP endógeno é acompanhada por uma segunda recombinação homóloga entre uma segunda região de homologia da construção de direccionamento e uma segunda sequência do gene de APP endógeno, resultando assim na porção da construção de direccionamento que foi localizada entre as duas regiões de homologia que substituem a porção do gene de APP endógeno que foi localizado entre as primeira e segunda sequências do gene de APP endógeno. Por este motivo, as regiões de homologia são geralmente utilizadas na mesma orientação (*i.e.*, o sentido a montante é o mesmo para cada região de homologia de um transgene para evitar rearranjos). A recombinação de substituição de dupla permutação pode assim ser utilizada para efectuar a deleção de uma porção de um gene de APP endógeno e a concomitante transferência de uma porção não homóloga (*e.g.*, uma cassete de expressão do gene *neo*) para a localização cromossómica correspondente. A recombinação de dupla permutação pode também ser utilizada para adicionar uma porção não homóloga num gene de APP endógeno sem deleção de porções cromossómicas endógenas. Contudo, a recombinação de dupla permutação pode também ser empregue para simplesmente efectuar a deleção de uma porção da sequência de um gene de APP endógeno sem transferência de uma porção não homóloga para o gene de APP endógeno (veja-se Jasin *et al.* (1988) *Genes Devel.* 2:1353). A montante e/ou a jusante da porção não homóloga pode estar um gene que proporcione a identificação de se a recombinação homóloga de dupla permutação ocorreu; um tal gene é tipicamente o gene *tk* de HSV que pode ser utilizado para selecção negativa.

Tipicamente, as construções de direccionamento de acordo com a invenção são utilizadas para a ruptura funcional de genes de APP endógenos e

compreendem pelo menos duas regiões de homologia separadas por uma sequência não homóloga que contém uma cassete de expressão que codifica um marcador seleccionável, tal como *neo* (Smith e Berg (1984) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 4.9: 171; Sedivy e Sharp (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 86: 227; Thomas e Capecchi (1987) *op.cit.*). Contudo, alguns transgenes de direccionamento de acordo com a invenção podem ter a região ou as regiões de homologia flanqueando apenas um dos lados de uma sequência não homóloga. Os transgenes de direccionamento de acordo com a invenção também podem ser do tipo referido na arte como transgenes "*hit-and-run*" ou "*in-and-out*" (Valancius e Smithies (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11: 1402; Donehower *et al.* (1992) *Nature* 356: 215; (1991) *J. NIH Res.* 3: 59).

A cassete de expressão de selecção positiva codifica um marcador seleccionável que proporciona um meio para seleccionar as células que integraram sequências do transgene de direccionamento que se estendem na cassete de expressão de selecção positiva. A cassete de expressão de selecção negativa codifica um marcador seleccionável que proporciona um meio para seleccionar as células que não integraram uma cópia da cassete de expressão de selecção negativa. Assim, através de um protocolo que combina selecção positiva e negativa, é possível seleccionar as células que sofreram recombinação homóloga de substituição e incorporaram a porção do transgene entre as regiões de homologia (*i.e.*, a região de substituição) numa localização cromossómica através da selecção quanto à presença do marcador positivo e à ausência do marcador negativo.

As cassetes de expressão preferidas para inclusão nas construções de direccionamento codificam e expressam um marcador seleccionável de resistência a uma droga e/ou uma enzima timidina-quinase de HSV. Os genes de resistência a drogas adequados incluem, por exemplo: *gpt* (xantina-guanina-fosforibosiltransferase), que pode ser seleccionado com ácido micofenólico; *neo* (neomicina-fosfotransferase), que pode ser seleccionado com G418 ou higromicina; e DFHR (di-hidrofolato-redutase), que pode ser seleccionado com metotrexato (Mulligan e Berg (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 78: 2072; Southern e Berg (1982) *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 327.

A selecção de recombinantes correctamente alvejados geralmente empregará pelo menos selecção positiva, em que uma cassete de expressão

não homóloga codifica e expressa uma proteína funcional (*e.g.*, *neo* ou *gpt*) que confere um fenótipo seleccionável às células alvejadas portadoras da cassete de expressão endogenamente integrada, de modo que, por adição de um agente de selecção (*e.g.*, G418 ou ácido micofenólico) essas células alvejadas têm uma vantagem de crescimento ou sobrevivência sobre células que não integraram a cassete de expressão.

É preferível que a selecção de recombinantes homólogos correctamente alvejados também empregue selecção negativa, de modo que as células portadoras apenas de integração não homóloga do transgene sejam seleccionadas. Tipicamente, esta selecção negativa emprega uma cassete de expressão que codifica o gene da timidina-quinase do vírus do herpes simples (*tk* de HSV) posicionado no transgene de modo que deverá ser integrado apenas por recombinação não homóloga. Este posicionamento é geralmente conseguido através de ligação da cassete de expressão do *tk* de HSV (ou outra cassete de selecção negativa) distal às regiões de homologia recombinogénicas de modo que a recombinação de substituição de dupla permutação das regiões de homologia transfira a cassete de expressão de selecção positiva para uma localização cromossómica mas não transfira o gene *tk* de HSV (ou outra cassete de selecção negativa) para uma localização cromossómica. Pode ser utilizado um análogo nucleosídico, o ganciclovir, que é preferencialmente tóxico para células que expressam *tk* de HSV, como agente de selecção negativa, uma vez que selecciona células que não integraram uma cassete de expressão de *tk* de HSV. Pode-se também utilizar FIAU como agente selectivo para seleccionar células a que falta *tk* de HSV.

De modo a reduzir a base de células possuindo sequências da construção de direccionamento incorrectamente integradas, utiliza-se tipicamente um esquema de selecção com uma combinação positiva-negativa (Mansour *et al.* (1988) *op.cit.*).

Geralmente, as construções de direccionamento incluem preferivelmente: (1) uma cassete de expressão de selecção positiva flanqueada por duas regiões de homologia que são substancialmente idênticas a sequências do gene de APP endógeno da célula hospedeira, e (2) uma cassete de expressão de selecção negativa distal. Contudo, também se podem utilizar construções de direccionamento que incluem apenas uma cassete de expressão de selecção

positiva. Tipicamente, uma construção de direccionamento conterá uma cassete de expressão de selecção positiva que inclui um gene *neo* ligado a jusante (*i.e.*, no sentido do terminal carboxi do polipéptido codificado na orientação do enquadramento de leitura para tradução) de um promotor tal como o promotor de *tk* de HSV ou o promotor de *pgk*. Mais tipicamente, o transgene de direccionamento também conterá uma cassete de expressão de selecção negativa que inclui um gene *tk* de HSV ligado a jusante de um promotor de *tk* de HSV.

Prefere-se que as construções de direccionamento tenham regiões de homologia que sejam altamente homólogas à sequência ou sequências de ADN endógenas alvo predeterminadas, preferivelmente isogénicas (*i.e.*, sequências idênticas). As sequências isogénicas ou quase isogénicas podem ser obtidas por clonagem genómica ou amplificação por PCR de alta fidelidade de ADN genómico da estirpe de animais que não humanos que são a fonte das células ES utilizadas no procedimento de direccionamento a genes.

Para a ruptura do gene de APP de murídeo, pode-se utilizar uma construção de direccionamento baseada no desenho empregue por Jaenisch e colaboradores (Zjilstra, *et al.* (1989) *op.cit.*) para a ruptura bem sucedida do gene de β2-microglobulina de ratinho. O gene de resistência à neomicina (*neo*), do plasmídeo pMC1NEO é inserido na região de codificação do gene de APP alvo. A inserção de pMC1NEO utiliza uma sequência híbrida de promotor viral/potenciador para conduzir a expressão de *neo*. Este promotor é activo em hemocitoblastos embrionários. Assim, pode-se utilizar o *neo* como marcador seleccionável quanto à integração da construção "*knockout*". O gene de timidina-quinase (*tk*) de HSV é adicionado à extremidade da construção como marcador de selecção negativa contra eventos de inserção aleatória (Zjilstra, *et al.*, *op. cit.*).

Os vectores que contêm uma construção de direccionamento são tipicamente crescidos em *E. coli* e depois isolados utilizando métodos *standard* de biologia molecular, ou podem ser sintetizados como oligonucleótidos. A inactivação directa direccionada que não requer vectores procarióticos nem eucarióticos pode também ser realizada. Os transgenes de direccionamento podem ser transferidos para células hospedeiras através de qualquer técnica adequada, incluindo microinjecção, electroporação, lipofecção, biolística,

precipitação com fosfato de cálcio, e vectores de base viral, entre outros. Outros métodos utilizados para transformar células de mamífero incluem a utilização de Polybrene, fusão de protoplastos, e outros (veja-se, genericamente, Sambrook *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).

Para preparar animais transgénicos, que não humanos, (que incluem animais que não humanos alvejados de modo homólogo), preferem-se hemocitoblastos (células ES) embrionários. As células ES de murídeo, tais como a linha AB-1 crescida em camadas alimentadoras de células SNL76/7 mitoticamente inactivas (McMahon e Bradley (1990) *Cell* 62: 1073) essencialmente como descrito (Robertson, E.J. (1987) em *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*. E.J. Robertson, ed. (Oxford: IRL Press), pág. 71-112) podem ser utilizadas para o direccionamento a genes homólogos. Outras linhas de células ES adequadas incluem, mas não se lhes limitam, a linha E14 (Hooper *et al.* (1987) *Nature* 326: 292-295), a linha D3 (Doetschman *et al.* (1985) *J. Embryol. Exp. Morph.* 87: 27-45), e a linha CCE (Robertson *et al.* (1986) *Nature* 323: 445-448). O sucesso da produção de uma linha de ratinho a partir de células ES portadoras de uma mutação específica direccionada depende da pluripotência das células ES (*i.e.*, da sua capacidade, uma vez injectadas num blastocisto de um hospedeiro, para participar na embriogénese e contribuir para as células germinativas do animal resultante). Deixam-se os blastocistos que contêm as células ES injectadas desenvolver no útero de fêmeas não humanas pseudográvidas e nascem ratinhos quiméricos. Os ratinhos transgénicos resultantes são quiméricos quanto a células possuindo *loci* de APP endógenos inactivados e são cruzados e pesquisados quanto à presença do(s) transgene(s) correctamente direccionado(s) por análise de PCR ou de transferência de *Southern* em ADN de biópsias da cauda das crias de modo a identificar os ratinhos transgénicos heterozigóticos para o *locus* de APP inactivado. Realizando os cruzamentos apropriados, é possível produzir um animal transgénico, que não humano, homozigótico para alelos de APP funcionalmente corrompidos, e opcionalmente também portadores de um transgene que codifica um polipéptido de APP heterólogo compreendendo a mutação sueca. Estes animais transgénicos são substancialmente incapazes de produzir um produto de um gene de APP endógeno mas expressam a APP heteróloga com a mutação sueca.

Utilização em investigação e pesquisa comerciais

Os animais que não humanos compreendendo transgenes que codificam APP com a mutação sueca (e assim Aβ com a mutação sueca), podem ser utilizados comercialmente para pesquisar agentes possuindo o efeito baixar a produção e/ou a acumulação de Aβ. Estes agentes podem ser desenvolvidos como fármacos para o tratamento do processamento de APP anormal e/ou da doença de Alzheimer, entre outras condições neurodegenerativas. Por exemplo, os ratinhos ***knockout*** de p53 de Donehower *et al.* (1992) *Nature* 356:215 encontraram grande aceitação como produtos comerciais para a pesquisa de carcinogénios e semelhantes. Os animais transgénicos aqui descritos exibem processamento e expressão de APP anormais, e podem ser utilizados para a pesquisa de fármacos e como modelos de doenças para doenças neurodegenerativas e bioquímica da APP. Estes animais têm muitas utilizações incluindo, mas não se lhe limitando, a identificação de compostos que efectuam ou afectam o processamento de Aβ; numa variação, os agentes são assim identificados como agentes farmacêuticos candidatos. Os animais transgénicos podem também ser utilizados para desenvolver agentes que modulam a expressão e/ou a estabilidade de APP (ou Aβ); estes agentes podem servir como agentes terapêuticos para tratar doenças neurodegenerativas. Os animais "*knockout*" de acordo com a invenção podem também servir como modelos de doença para a investigação de condições patológicas relacionadas com APP (*e.g.*, doença de Alzheimer e semelhantes). Estes animais transgénicos podem ser comercializados para investigadores, entre outras utilizações.

Anticorpos contra a APP com a mutação sueca

Utilizando polipéptidos de APP compreendendo a mutação sueca, é então possível preparar anti-soros e anticorpos monoclonais utilizando, por exemplo, o método de Kohler e Milstein ((1975) *Nature* 256:495). Estes anticorpos monoclonais podem então formar a base de um teste de diagnóstico quanto à presença da mutação sueca, entre outras utilizações.

Os polipéptidos de APP com a mutação sueca podem ser utilizados para imunizar um animal para a produção de anticorpos específicos. Estes anticorpos podem compreender um anti-soro policlonal ou podem compreender um anticorpo monoclonal produzido por células de hibridoma. Quanto a métodos gerais para preparar anticorpos, veja-se *Antibodies: A Laboratory Manual*, (1988) E. Harlow e D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.

Como exemplo, mas sem limitação, um fragmento produzido recombinantemente de polipéptido de APP^{695} com a mutação sueca pode ser injectado num ratinho juntamente com um adjuvante de modo a gerar uma resposta imunitária. As imunoglobulinas de murídeo que se ligam ao fragmento recombinante com uma afinidade de ligação de pelo menos $1x10^7$ M^{-1} podem ser recolhidas do ratinho imunizado na forma de um anti-soro, e podem ser adicionalmente purificadas por cromatografia de afinidade ou outro meio. Adicionalmente, são recolhidas células do baço do ratinho que são fundidas em células de mieloma para produzir um banco de células de hibridoma que segregam anticorpos. O banco de hibridomas pode ser pesquisado quanto a clones que segregam imunoglobulinas que se ligam ao fragmento produzido recombinantemente com uma afinidade de pelo menos $1x10^6$ M^{-1}. Mais especificamente, seleccionam-se as imunoglobulinas que se ligam ao polipéptido de APP com a mutação sueca mas têm uma reactividade cruzada limitada com um polipéptido de APP do tipo selvagem, quer por pré-absorção com APP do tipo selvagem quer por pesquisa de linhas celulares de hibridoma quanto a idiótipos específicos que preferencialmente se ligam à variante com a mutação sueca em comparação com a do tipo selvagem.

Os exemplos seguintes são proporcionados para ilustração e não se destinam a limitar a invenção ao exemplo específico proporcionado.

EXEMPLOS EXPERIMENTAIS

O anticorpo 6C6 reconhece um epítopo nos resíduos 1-16 de βAP.

Ratinhos transgénicos que expressam APP com a mutação sueca

Produziram-se ratinhos transgénicos utilizando os plasmídeos apresentados na Fig. 1 (NSEAPPsw e NSEAPPswΔ3'). Estes plasmídeos contêm a forma 751 de βAPP contendo a mutação sueca (KM para NL na posição 595 e 596 da forma 695). O promotor de enolase específico de neurónios conduz a expressão e proporciona uma sequência de união. O promotor de NSE de rato e as sequências de união eram derivadas de pNSE6 (Forss-Petter *et al.* (1990) *Neuron* 5: 187). Este vector contém o fragmento *Bgl*II de 4,2 kb da região do promotor de NSE de rato (começando no local *Bgl*II a montante e continuando até ao local *Bgl*II no segundo intrão) clonado no local *Bam*HI do vector pSP65

(Promega). O local *Xba*I derivado do vector na extremidade 5' do promotor utilizado e o ATG iniciador da tradução de NSE, contido no segundo intrão, foram fundidos com o ATG que inicia βAPP.

O NSEAPPsw também contém uma sequência de união de SV40 na região 3' do gene. Esta sequência de união foi derivada do vector pL1 Okayama/Berg, e é uma fusão das sequências de união 16s tardia e 19s. A poliadenilação é proporcionada pelas sequências de SV40.

Os ratinhos transgénicos que incorporavam estas sequências plasmídicas foram gerados utilizando técnicas *standard*. O fragmento *Not*I que continha a cassete de expressão acima descrita foi purificado e injectado em ovos obtidos de um ratinho híbrido C57B1/DBA. Os ovos foram implantados em ratinhos pseudográvidas e as crias foram pesquisadas quanto à expressão de βAPP humana por análise das suas crias F1 transgénicas. Os cérebros dos animais F1 foram homogeneizados com a homogeneizador manual (Polytron PT122B, Kinematica AG) quer em tampão de SDS (SDS a 2%, Tris 20 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM) ou homogeneizados em tampão NP-40 (NP40 a 1%, Tris 50 mM, pH 7,5, EDTA 10 mM, e um *cocktail* de inibidores de protease contendo leupeptina 5-10 μg/ml, Pepstatina A 2-4 μg/ml, Aprotinina 5-10 μg/ml, e PMSF 1-2 mM). Os lidados em SDS foram carregados directamente em geles para análise de *Western*. Os homogeneizados em NP40 foram centrifugados a 44 000 rpm durante 10 minutos numa ultracentrífuga Beckman (rotor TI100.3) e os sobrenadantes foram carregados em geles para análise de *Western*. A análise de *Western* foi realizada através de procedimentos *standard* utilizando anticorpos anti-5 (0,4 μg/ml) ou 8E5 (5 μg/ml) para detectar a βAPP humana específica. As linhas que expressam níveis relativamente elevados de βAPP foram escolhidas para análise adicional. Estas incluíram as linhas Hillary 14, Chelsea 32 e Chelsea 58. As experiências descritas foram realizadas em animais heterozigóticos destas linhas derivados por criação de animais contendo o transgene com animais do tipo selvagem e pesquisa das crias quanto à presença do transgene. De modo semelhante, podem ser utilizados animais homozigóticos de um número seleccionado de linhas.

As fracções solúveis de cérebros de animais transgénicos foram sondadas quanto à presença da forma "92" da APP segregada (Fig. 2). Esta

forma é produzida na forma de um subproduto da produção de βAP e a inibição da produção desta forma em células de cultura acompanha a inibição da clivagem da extremidade N-terminal de βAP, o local clivado por β-secretase.

Cérebros de ratinhos transgénicos (Swedish Hillary 14) ou não transgénicos foram homogeneizados em Tris 50 mM, EDTA 10 mM mais o *cocktail* inibidor de proteases acima descrito e foram centrifugados a 55K rpm durante 10 min como acima descrito. O sobrenadante foi analisado por análise de *Western* utilizando o anticorpo sueco "192" que reage apenas com a forma segregada de APP produzida por β-secretase. Para a análise de *Western,* separaram-se as proteínas num gel de SDS a 6%, PAGE (de Novex) e depois transferiram-se para immobilonP por técnicas *standard*. Incubou-se o filtro com 2 μg/ml do anticorpo sueco "192" de novo utilizando técnicas *standard* e visualizou-se o anticorpo ligado utilizando o estojo AmershamECL. Como apresentado na Fig. 2, pista 3, existia material reactivo "92" robustamente detectável no sobrenadante do animal transgénico. O homogeneizado do cérebro do animal não transgénico continha um pequena quantidade de material imunorreactivo que é ligeiramente mais rápido em mobilidade no gel do que o material específico para o animal transgénico (pista 1). Este material não está provavelmente relacionado com βAPP uma vez que não hibrida com outros anticorpos contra βAPP (*e.g.*, anti-5).

Em sistemas de cultura de tecidos, o anticorpo sueco 192 (*infra*) não reage de forma cruzada com βAPP segregada que é clivada no local da alfa-secretase na posição 17 no meio da sequência do β-péptido. Para provar que isto é também verdade nos homogeneizados de cérebro, os homogeneizados de cérebro foram desprovidos das formas mais longas de βAPP segregadas utilizando resina ligada ao anticorpo 6C6, que é específico para os primeiros 16 aminoácidos da βAP, e portanto reage com βAPP segregada clivada por alfa-secretase mas não com a βAPP segregada clivada com β-secretase, mais curta. A resina foi produzida utilizando Actigel-ALS acoplado em suspensão como descrito pelo fabricante (Sterogene). Incubou-se um excesso de resina-anticorpo com os homogeneizados de cérebro de animais, quer contendo, quer não, o transgene, durante uma incubação inicial de 3 horas a 4°C com agitação, e separou-se o material ligado e não ligado por centrifugação a 14 000 rpm durante 1 min. Incubou-se novamente o sobrenadante com um excesso de 6C6 acoplado à resina durante 16 horas a

4°C, e centrifugou-se de novo para separar o material não ligado. O material que se ligou durante a primeira incubação e o material que não se ligou ao 6C6 acoplado à resina foram analisados por análise de *Western* utilizando os anticorpos anti-5 e sueco 192 (Fig. 3). Os homogeneizados de ratinhos transgénicos (+) ou não transgénicos (-) foram sondados com 8E5 (painel A) ou sueco 192 (painel B). As pistas 1 referem-se ao homogeneizado total, as pistas 2 à fracção que não se ligou ao 6C6-resina e as pistas 3 referem-se à fracção que se ligou ao 6C6 acoplado à resina. Nenhuma da βAPP ligada, identificada através da sua reactividade com o anticorpo anti-5, reagiu de forma cruzada com o anticorpo sueco 192. O material não ligado, identificado pela reactividade com anti-5, reagiu com o anticorpo sueco 192.

Isto demonstra que o ratinho transgénico com a mutação sueca proporciona um modelo animal viável para a pesquisa de inibidores directos ou indirectos de actividade de β-secretase, ou de drogas que modulam a actividade de β-secretase. Estes agentes podem ser desenvolvidos como fármacos para o tratamento de doenças associadas a expressão e/ou metabolismo de APP anormais (*e.g.*, doença de Alzheimer).

Anticorpos especificamente reactivos com APP com a mutação sueca

Criaram-se anticorpos monoclonais 6C6 e pesquisaram-se da mesma maneira que o anticorpo 10D5 (Hyman *et al.* (1992) *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 51: 76) utilizando um péptido sintético contendo os resíduos 1-28 de βAP conjugado com albumina sérica de coelho como imunogénio. Tanto o 10D5 como o 6C6 reconhecem um epítopo dentro dos primeiros 16 aminoácidos da sequência de βAP. O 6C6 foi mais eficiente do que o 10D5 na imunoprecipitação e foi utilizado como um anticorpo de captura. Para preparar 6C6-resina, lavaram-se 4 ml de Affigel®10 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) com água fria e combinaram-se com 3 ml de 6C6 (12,5 mg/ml em PBS (KCl 2,7 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, Na_2HPO_4 8,1 mM, NaCl 137 mM, pH 7,5) NaCl 0,5M. O acoplamento prosseguiu durante uma noite a 4°C com agitação suave. Adicionaram-se então 400 µl de Tris 1M, pH 8,0, e continuou-se a agitação durante 40 minutos. Lavou-se então a resina com TTBS (NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Tris 25mM, Tween®20 a 0,5%, pH 7,5) exaustivamente, antes da utilização. O anticorpo 7H5 é também descrito em Hyman *et al.* (1992), *supra*. Os anticorpos anti-5 foram criados contra βAPP 444-592.

Os anticorpos (designados anticorpo 92) foram criados contra um péptido sintético incluindo os resíduos 591-596 de βAPP (tal como numerados em Kang *et al.* (1987), *supra*). O péptido (N-acetil-CISEVKM) foi conjugado com albumina sérica de coelho que tinha sido activada com éster de sulfomaleimidobenzoil-N-hidroxissuccinimida para formar um imunogénio. Os anti-soros foram criados contra o imunogénio em coelhos através de metodologias *standard*. Durante cada inoculação, os coelhos receberam 5 μg de imunogénio em injecções subcutâneas de 0,1 ml em aproximadamente 10 locais (50 μg/reforço). Acoplou-se o mesmo péptido a gel de Sulfo-link™ (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) para a purificação por afinidade de anticorpos da fracção de IgG.

Segue-se uma descrição mais detalhada da preparação do anticorpo 92. Incubou-se albumina sérica de coelho (12,3 mg) com 13 mg de éster sulfomaleimidobenzoil-N-hidroxissuccinimida em 1,25 ml de KH_2PO_4 0,05M, pH 7,0 durante 20 minutos a 0°C. A mistura foi então imediatamente submetida a filtração em gel numa coluna de 1x75 cm de Sephadex G-10 equilibrada com o tampão fosfato. A proteína que elui no volume excluído foi reunida e imediatamente combinada com 30 mg de péptido N-acetil-CISEVKM que foi sintetizado por metodologias em fase sólida automáticas *standard*. Deixou-se prosseguir a reacção de acoplamento (20 ml de volume) durante a noite e foi então enviada a uma instalação industrial para a produção do anticorpo. O protocolo de injecção consistiu em emulsionar o antigénio num volume igual de adjuvante de Freund completo e em injectar subcutaneamente um total de 50 μg de antigénio em alíquotas de 0,1 ml em aproximadamente 10 locais. A cada três semanas seguintes, foi dada uma injecção de reforço através de um protocolo idêntico com a excepção da utilização de adjuvante de Freund incompleto como emulsionante. Sangraram-se os coelhos uma semana após cada injecção e examinou-se o soro quanto ao título por reacção com péptido em ELISA. Purificou-se a IgG dos soros que reagiram de forma positiva por precipitação com $(NH_4)_2SO_4$ a 50%, (2x) e dializou-se contra PBS. O péptido N-acetil-CISEVKM foi conjugado com gel Sulfo-link™ (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) utilizando as recomendações do fabricante para gerar uma resina de afinidade para purificar os anticorpos específicos para o péptido. Aplicou-se a fracção de IgG à coluna e, após lavagem do material que não se ligou especificamente com PBS, eluíram-se os anticorpos com glicina 0,1M, pH 2,5, NaCl 0,5M e depois dializaram-se *vs* PBS antes de se congelarem.

O anticorpo sueco 192 foi criado contra um péptido sintético composto pelos resíduos 590-596 da sequência de βAPP sueca. Em adição à sequência de βAPP, adicionaram-se duas glicinas e uma cisteína como espaçador e ligante originando a seguinte sequência: CGGEISEVNL. O péptido foi conjugado com uma albumina sérica bovina cationizada activada por maleimida, disponível no comércio (Pierce Imject Supercarrier Immune Modulator, aqui seguidamente referida como cBSA.) O anti-soro foi criado seguindo o esquema de injecções acima descrito para o anticorpo 92. O anticorpo sueco 192 foi criado contra um péptido sintético composto pelos resíduos 590-596 da sequência de βAPP sueca. Em adição à sequência de βAPP adicionaram-se duas glicinas e uma cisteína como espaçador e ligante originado a seguinte sequência: CGGEISEVNK. O péptido foi conjugado com uma albumina sérica bovina cationizada activada por maleimida, disponível no comércio (Pierce Imject Supercarrier immune Modulator, aqui seguidamente referida como cBSA.) O anti-soro foi criado seguindo um esquema de injecções *standard*.

Genericamente, ressuspendeu-se a cBSA em água desionizada a uma concentração de 10 mg/ml. Uma igual quantidade em miligramas de péptido foi adicionada ao transportador e misturada durante quatro horas à temperatura ambiente. O conjugado foi então dializado intensivamente contra solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco sem cálcio nem magnésio.

O conjugado foi comparado com a cBSA de partida num gel de Tris-glicina pré-vertido em Novex a 6%. A conjugação bem sucedida foi indicada por um desvio visível para um peso molecular superior.

Recolheu-se meio condicionado de células de rim 293, que tinham sido transfectadas de forma estável para superexpressar a proteína βAPP sueca. Adicionaram-se alíquotas de um mililitro a 100 µl de 6C6 imobilizado na resina de afinidade ou a 100 µl de agarose com heparina (Sigma). A reacção com a resina com 6C6 decorreu durante 5 horas a 4°C; a agarose com heparina reagiu durante 30 minutos a 4°C. Após a incubação, lavaram-se as resinas com TTBS e depois adicionaram-se 100 µl de tampão de amostra 2xSDS-PAGE a cada amostra, ferveram-se as amostras (5 minutos) e centrifugaram-se brevemente. Carregaram-se vinte µl das amostras em geles de SDS a 6%-poliacrilamida e efectuou-se a electroforese. Transferiram-se as proteínas para membranas ProBlot® como descrito acima. Sondaram-se as amostras com os seguintes

anticorpos: 6C6, sueco 192, ou 8E5 (um anticorpo monoclonal que reconhece um epítopo de βAPP na região dos aminoácidos 444-592, utilizando a numeração da forma 695.) Todos os anticorpos foram utilizados a 2 μg/ml durante a sondagem da imunotransferência. A visualização de material imunorreactivo foi realizada utilizando o sistema ECL® de Amersham de acordo com as recomendações do fabricante. O bloqueio e as diluições de anticorpo foram realizadas utilizando leite em pó não gordo (Carnation) a 5% em TTBS.

A Fig. 4 apresenta uma imunotransferência que demonstra a especificidade do anticorpo sueco 192. As pistas 1, 3, 5 contêm o material eluído de agarose com heparina. As pistas 2, 4, 6 contêm o material eluído de resina com 6C6. As pistas 1 e 2 foram sondadas com anticorpo 8E5; As pistas 3 e 4 foram sondadas com o anticorpo sueco 192; As pistas 5 e 6 foram sondadas com anticorpo 6C6.

Como se pode observar na Figura 4, pista 4, o anticorpo sueco 192 não reconhece apreciavelmente a forma reactiva com 6C6 de βAPP apesar do facto de estar presente mais βAPP total na pista 4 em comparação com a pista 3 (comparem-se as pistas 1 e 2). A falta de reactividade com formas de βAPP contendo a sequência parcial βAP (reactiva com 6C6) sugere que o anticorpo sueco 192 reconhece βAPP clivada no, ou próximo do, terminal amino de Aβ.

A descrição anterior das concretizações preferidas da presente invenção foi apresentada para fins de ilustração e descrição. Não se pretende que sejam exaustivas ou que limitem a invenção à forma precisa descrita, e são possíveis muitas modificações e variações à luz dos ensinamentos anteriores.

Tais modificações e variações que podem ser óbvias a um perito na arte pretendem-se dentro do âmbito da presente invenção.

Lisboa, 27 MAR 2001

Por ELAN PHARMACEUTICALS, INC. e ELI LILLY AND COMPANY

- O AGENTE OFICIAL -

ENG.º ANTÓNIO JOÃO DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74 - 4.º
1200 LISBOA

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de um animal ou um hemocitoblasto transgénicos, que não humanos, compreendendo um genoma diplóide compreendendo um transgene que codifica um polipéptido de APP heterólogo compreendendo a mutação sueca em que os resíduos de aminoácido nas posições correspondentes às posições 595 e 596 na APP^{695} humana são asparagina e leucina, respectivamente, para pesquisar um agente quanto a actividade na prevenção, inibição ou reversão da doença de Alzheimer.

2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o animal é murídeo.

3. Utilização de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, em que o transgene é integrado de modo não homólogo.

4. Utilização de um animal transgénico, que não humano, de acordo com a reivindicação 1, em que o referido animal transgénico, que não humano, expressa um polipéptido de APP humana compreendendo a mutação sueca da reivindicação 1.

5. Utilização de um animal transgénico, que não humano, de acordo com a reivindicação 1, em que o polipéptido de APP heterólogo compreendendo a mutação sueca da reivindicação 1, é expresso sob o controlo transcricional de um promotor de enolase específico de neurónios.

6. Utilização de um transgene que codifica um polipéptido de APP heterólogo compreendendo a mutação sueca em que os resíduos de aminoácido nas posições correspondentes às posições 595 e 596 no APP^{695} humano são asparagina e leucina, respectivamente, para produzir um animal transgénico, que não humano, para pesquisar um agente quanto a actividade na prevenção, inibição ou reversão da doença de Alzheimer.

Lisboa, 27 MAR 2001

Por ELAN PHARMACEUTICALS, INC. e ELI LILLY AND COMPANY
- O AGENTE OFICIAL -

ENG.º ANTÓNIO JOÃO DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74 - 4.º
1200 LISBOA

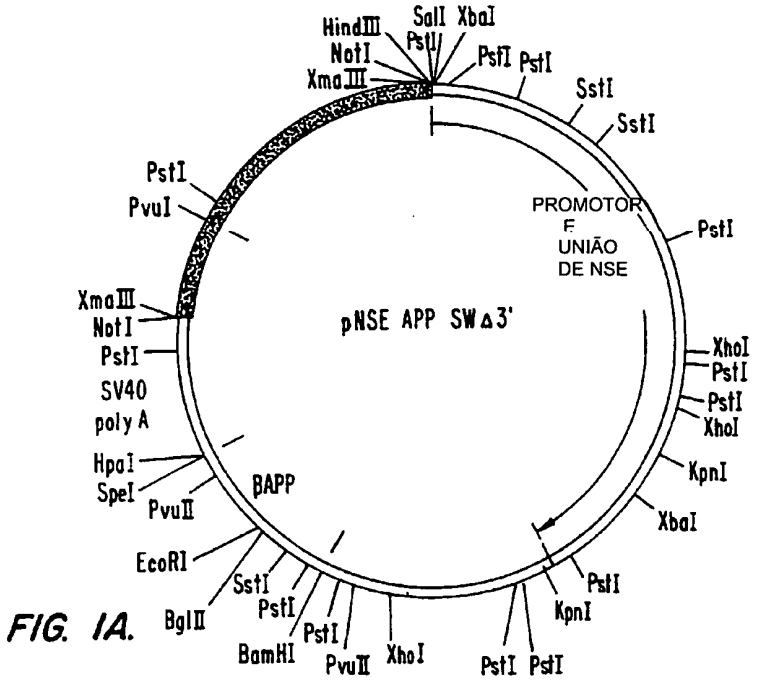

HindIII
SalI XbaI
PstI
NotI
PstI PstI
XmaIII
SstI
SstI
PstI
PvuI
PROMOTOR
E
UNIÃO
DE NSE
PstI
pNSE APP SWΔ3'
XmaIII
NotI
PstI
XhoI
PstI
SV40
poly A
PstI
XhoI
HpaI
KpnI
SpeI
βAPP
PvuII
XbaI
EcoRI
PstI
SstI
PstI
BglII
PstI
PstI
BamHI
PvuII
XhoI
PstI PstI

FIG. IA.

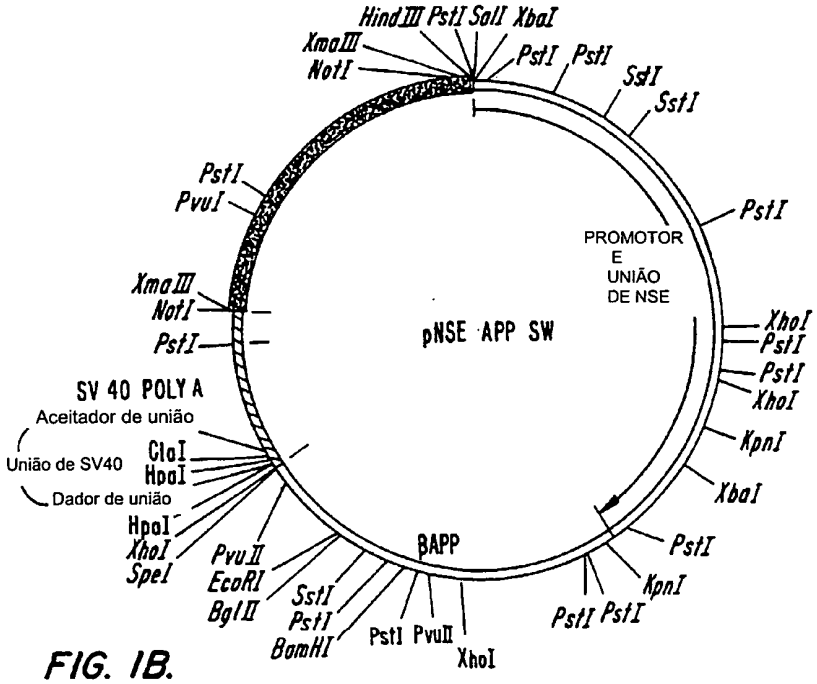

HindIII PstI SalI XbaI
XmaIII
NotI
PstI PstI
SstI
SstI
PstI
PvuI
PROMOTOR
E
UNIÃO
DE NSE
PstI
XmaIII
NotI
pNSE APP SW
XhoI
PstI
PstI
XhoI
PstI
KpnI
SV 40 POLY A
Aceitador de união
União de SV40
ClaI
HpaI
Dador de união
XbaI
HpaI
XhoI
SpeI
PvuII
EcoRI
BglII
βAPP
PstI
KpnI
SstI
PstI
BamHI
PstI PvuII
XhoI
PstI PstI

FIG. IB.

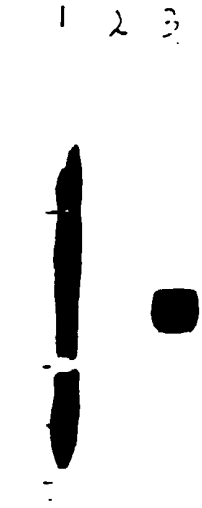


FIGURA 2

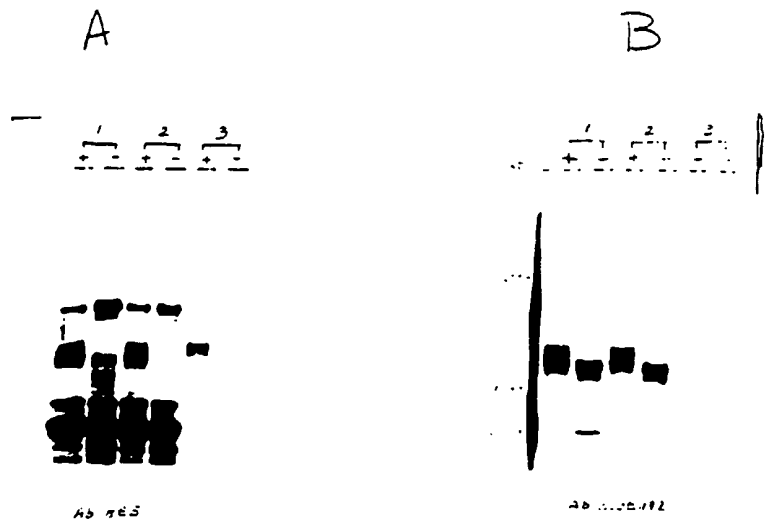


FIGURA 3

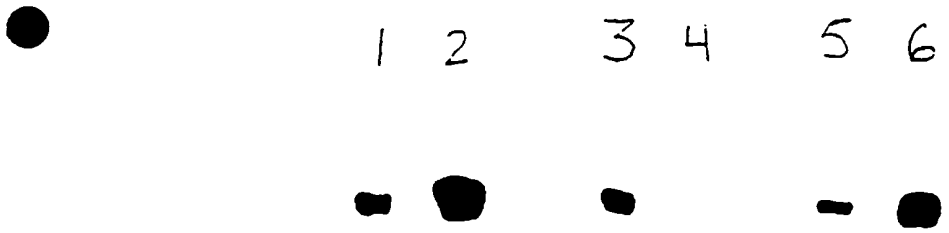


FIGURA 4