(11) Número de Publicação: **PT 1994937 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 39/395 (2009.01) ***A61P 25/28*** (2009.01)
A61K 38/00 (2009.01) ***A61K 38/28*** (2009.01)
A61K 9/26 (2009.01) ***A61K 33/06*** (2009.01)

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

(22) Data de pedido: **1998.11.30**

(30) Prioridade(s): **1997.12.02 US 67740 P**
1998.04.07 US 80970 P

(43) Data de publicação do pedido: **2008.11.26**

(45) Data e BPI da concessão: **2010.12.29**
037/2011

(73) Titular(es):
JANSSEN ALZHEIMER IMMUNOTHERAPY
LITTLE ISLAND INDUSTRIAL ESTATE LITTLE ISLAND, COUNTY CORK **IE**

(72) Inventor(es):
DALE B. SCHENK **US**

(74) Mandatário:
PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA
RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE DOENÇA AMILOIDOGÉNICA**

(57) Resumo:
A INVENÇÃO PROPORCIONA COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS AMILOIDOGÉNICAS. TAIS MÉTODOS CARACTERIZAM-SE PELA ADMINISTRAÇÃO DE UM AGENTE QUE INDUZ UMA REPOSTA IMUNITÁRIA BENÉFICA CONTRA UM DEPÓSITO AMILÓIDE NO DOENTE. OS MÉTODOS SÃO PARTICULARMENTE ÚTEIS PARA O TRATAMENTO PROFILÁTICO E TERAPÊUTICO DA DOENÇA DE ALZHEIMER. EM TAIS MÉTODOS, UM AGENTE ADEQUADO É O PÉPTIDO AΒ OU UM ANTICORPO CONTRA O MESMO.

DESCRIÇÃO

"PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE DOENÇA AMILOIDOGÉNICA"

CAMPO TÉCNICO

A invenção situa-se nos campos técnicos da imunologia e da medicina.

ANTECEDENTES

A doença de Alzheimer (AD) é uma doença progressiva que resulta em demência senil. *Ver, de um modo geral*, Selkoc, TINS 16, 403-409 (1993); Hardy *et al.*, documento WO 92/13069; Selkoe, J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53, 438-447 (1994); Duff *et al.*, Nature 373, 476-477 (1995); Games *et al.*, Nature 373,5 523 (1995). Falando de um modo genérico, a doença pode dividir-se em duas categorias: a de aparecimento tardio, que ocorre em idade avançada (+ de 65 anos) e a de aparecimento precoce, que se desenvolve muito antes do período senil, *i. e.*, entre os 35 e os 60 anos. Em ambos os tipos de doença, a patologia é a mesma mas as anormalidades tendem a ser mais graves e disseminadas nos casos do início numa idade mais precoce. A doença caracteriza-se por dois tipos de lesões no cérebro, placas senis e novelos neurofibrilhares. As placas senis são áreas de neurópilo desorganizado até 150 μm de comprimento com depósitos amilóides extracelulares no centro visíveis por análise microscópica de cortes de tecido do cérebro. Os novelos neurofibrilhares são depósitos intracelulares de proteínas tau consistindo em dois

filamentos enrolados um à volta do outro, aos pares.

O principal constituinte das placas é um péptido designado péptido amilóide β ou Aβ. O péptido Aβ é um fragmento interno de 39-43 aminoácidos de uma proteína precursora designada proteína precursora amilóide (APP). Várias mutações dentro da proteína APP têm sido correlacionadas com a presença de doença de Alzheimer. Ver, *e. g.*, Goate *et al.*, Nature 349, 704) (1991) (valina^{717} para isoleucina); Chartier Harlan *et al.*, Nature 353, 844 (1991)) (valina^{717} para glicina); Murrell *et al.*, Science 254, 97 (1991) (valina^{717} para fenilalanina); Mullan *et al.*, Nature Genet. 1, 345 (1992) (uma dupla mutação que altera lisina^{595}-metionina^{596} para asparagina^{595}-leucina^{596}). Pensa-se que tais mutações causem a doença de Alzheimer através do aumento ou da alteração do processamento de APP para Aβ, particularmente o processamento de APP para quantidades maiores da forma longa de Aβ (*i. e.*, Aβ1-42 e Aβ1-43). Pensa-se que mutações noutros genes, tais como os genes da presenilina, PS1 e PS2, afectem indirectamente o processamento de APP para gerar quantidades crescentes da forma longa Aβ (ver Hardy, TNS 20, 154 (1997)). Estas observações indicam que Aβ e, particularmente, a sua forma longa são um elemento etiológico na doença de Alzheimer.

O documento EP-A-0683234 divulga anticorpos com especificidade de ligação para amilóide β. A combinação destes anticorpos proporciona um método em que o amilóide β pode ser determinado especificamente com uma elevada sensibilidade. Este método é útil para diagnosticar doenças nas quais o amilóide β ou um seu derivado participa, tal como na doença de Alzheimer e os anticorpos são úteis para o desenvolvimento de agentes terapêuticos ou preventivos para a doença de Alzheimer.

McMichael, documento EP 526511, propõe a administração de dosagens homeopáticas (menores ou iguais a 10^{-2} mg/dia) de Aβ aos doentes com AD pré-estabelecida. Num humano típico, com cerca de 5 litros de plasma, espera-se que mesmo o limite superior desta dosagem dê origem a uma concentração não superior a 2 pg/mL. A concentração normal de Aβ no plasma humano é tipicamente na gama de 50-200 pg/mL (Seubert *et al.*, Nature 359, 325-327 (1992)). Devido à dose proposta no documento EP 526511 dificilmente alterar o nível de Aβ endógena em circulação e devido ao documento EP 526511 não recomendar a utilização de um adjuvante, parece pouco plausível que resulte em qualquer benefício terapêutico.

Pelo contrário, a presente divulgação é dirigida ao tratamento de Alzheimer e de outras doenças amiloidogénicas através da administração de um anticorpo Aβ, a um doente em condições que originam uma resposta imunitária benéfica no doente. Assim, a invenção vem preencher uma necessidade, há muito sentida, de regimes terapêuticos para a prevenção ou alívio da neuropatologia da doença de Alzheimer.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO REIVINDICADA

Num aspecto, a invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo contra Aβ e um veículo ou diluente não tóxico farmaceuticamente aceitável, para utilização nos métodos de prevenção ou tratamento de uma doença caracterizada por deposição amilóide num doente, em que o isotipo do anticorpo é a IgG2 humana. Tais métodos compreendem induzir uma resposta imunitária contra um componente peptídico de um depósito amilóide no doente por administração de um

anticorpo que tem o isotipo IgG1 humano. Em alguns doentes, o depósito amilóide está agregado ao péptido Aβ e a doença é a doença de Alzheimer. Em alguns métodos o doente é assimtomático. Em alguns métodos o doente tem menos de 50 anos de idade. Em alguns métodos o doente tem factores de risco hereditários que indicam susceptibilidade a doença de Alzheimer. Tais factores de risco incluem alelos variantes no gene APP. Noutros métodos, o doente não tem factores de risco conhecidos para a doença de Alzheimer.

Em alguns métodos a resposta imunitária é dirigida para a agregação do péptido Aβ sem ser dirigida para o péptido Aβ dissociado. Por exemplo, os anticorpos ligam-se ao péptido Aβ agregado sem se ligarem ao péptido Aβ dissociado. A resposta imunitária é induzida por administração de um anticorpo contra Aβ ao doente.

O anticorpo é tipicamente administrado oralmente, intranasalmente, intradermicamente, subcutaneamente, intramuscularmente, topicamente ou intravenosamente. Em alguns métodos, o doente é monitorizado após administração para avaliar a resposta imunitária. Se a monitorização indicar uma redução da resposta imunitária ao longo do tempo, o doente pode receber uma ou mais doses do anticorpo.

Um método *in vivo* de monitorizar a doença de Alzheimer ou a susceptibilidade a esta num doente, compreende a detecção de um anticorpo que se liga especificamente ao péptido Aβ numa amostra do doente, em que foi administrado ao doente uma composição farmacêutica de acordo com o primeiro aspecto eficaz para tratar ou prevenir a doença de Alzheimer e o nível de anticorpo detectado determina o futuro regime de tratamento do doente.

Um método *in vitro* de avaliar a eficácia de um método de tratamento de Alzheimer num doente compreende determinar um valor para uma quantidade de anticorpo específico para o péptido Aβ na amostra de tecido de um doente que foi tratado com uma composição farmacêutica de acordo com o primeiro aspecto. O valor é comparado com um valor controlo determinado a partir de uma população de doentes que tenham mostrado melhorias ou ausência de sintomas da doença de Alzheimer devido ao tratamento como anticorpo do primeiro aspecto. Um valor pelo menos igual ao valor do controlo indica uma resposta positiva ao tratamento.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Fig. 1: Título de anticorpos após injecção de murganhos transgénicos com Aβ1-42.

Fig. 2: Aumento da quantidade de amilóide no hipocampo. A percentagem da área da região do hipocampo ocupada pelas placas amilóides, definida pela reactividade com o mAβ 3D6 específico de Aβ, foi determinada por análise quantitativa de imagens auxiliada por computador das secções de cérebro imuno-reactivas. Os valores para murganhos individuais estão listados por grupo de tratamento. A linha horizontal para cada agrupamento indica o valor médio da distribuição.

Fig. 3: Distrofia neurítica no hipocampo. A percentagem da área da região do hipocampo ocupada pelas neurites distróficas, definidas pela sua reactividade com o mAβ 8ES específico de APP humana, foi determinada por análise quantitativa, auxiliada por computador, de imagens das secções de cérebro imuno-reactivas. Os valores para

murganhos individuais são mostrados para o grupo tratado com AN1792 e para o grupo de controlo tratado com PBS. A linha horizontal para cada agrupamento indica o valor médio da distribuição.

Fig. 4: Astrocitose no córtex retroesplenial. A percentagem da área da região cortical ocupada pelos astrócitos positivos para a proteína acídica fibrilhar da glia ("GFAP") foi determinada por análise quantitativa, auxiliada por computador, de imagens de secções de cérebro imuno-reactivas. Os valores para murganhos individuais são mostrados de acordo com o grupo de tratamento e os valores médios dos grupos estão indicados por linhas horizontais.

Fig. 5: Média geométrica dos títulos de anticorpos contra Aβ1-42 após imunização com uma gama de oito doses de AN1792 com 0,14, 0,4, 1,2, 3,7, 11, 33, 100 ou 300 µg.

Fig. 6: Cinética da resposta de anticorpos à imunização com AN1792. Os títulos são expressos como médias geométricas de valores para 6 animais de cada grupo.

Fig. 7 Análise quantitativa de imagens do aumento amilóide cortical em murganhos tratados com PBS e m AN1792.

Fig. 8: Análise quantitativa de imagens do aumento de placas neuríticas em murganhos tratados com PBS e com AN1792.

Fig. 9: Análise quantitativa de imagens da percentagem de córtex retroesplenial ocupado por astrocitose em murganhos tratados com PBS e com AN1792.

Fig. 10: Ensaio de proliferação de linfócitos das células do baço de murganhos tratados com AN1792 (painel superior) ou tratados com PBS (painel inferior).

Fig. 11: Níveis totais de Aβ no cortéx. Um gráfico de perfis de Aβ individuais em murganhos imunizados com derivados de Aβ ou de APP combinados com adjuvante de Freund.

Fig. 12: O desenvolvimento amilóide no córtex foi determinado por análise quantitativa de imagens de secções de cérebro imuno-reactivas para murganhos imunizados com os conjugados dos péptidos Aβ1-5, Aβ1-12 e Aβ13-28; os agregados Aβ de tamanho completo AN1792 (Aβ1-42) e AN1528 (Aβ1-40) e o grupo de controlo tratado com PBS.

Fig. 13: Média geométrica dos títulos de anticorpos específicos de Aβ para grupos de murganhos imunizados com Aβ ou com derivados de APP combinados com adjuvante de Freund.

Fig. 14: Média geométrica dos títulos de anticorpos específicos de Aβ para grupos de cobaios imunizados com AN1792, ou com um seu derivado palmitoilado, combinado com vários adjuvantes.

Fig. 15 Níveis de Aβ no córtex de murganhos PDAPP de 12 meses de idade tratados com AN1792 ou com AN1528 com diferentes adjuvantes.

DEFINIÇÕES

O termo "identidade substancial" significa que duas sequências peptídicas, quando optimamente alinhadas, tal como através dos programas GAP e BESTFIT utilizando pesos dos intervalos por defeito, partilham, pelo menos, 65 por centro de identidade de sequências, de um modo preferido, pelo menos, 80 ou 90 por cento de identidade de sequências, de um modo mais preferido, pelo menos, 95 por cento de identidade de sequências ou mais (*e. g.*, 99 por cento ou mais de identidade). De um modo preferido, as posições dos resíduos que não são idênticas diferem em substituições conservadas de aminoácidos.

Para comparação de sequências, tipicamente uma sequência actua como uma sequência de referência, com a qual são comparadas as sequências a testar. Quando se utiliza um algoritmo para comparação de sequências, as sequências a testar e a referência são introduzidas num computador, são designadas as coordenadas das subsequências, se necessário, e designados os parâmetros do programa do algoritmo de comparação das sequências. O algoritmo para comparação de sequências calcula então a percentagem de identidade de sequências para a(s) sequência(s) a testar relativamente à sequência de referência, baseado nos parâmetros do programa designados.

O alinhamento óptimo de sequências para comparação pode ser realizado, *e. g.*, através dos algoritmos de homologia local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), através do algoritmo de homologias de alinhamentos de Needleman & Wunsch, J. MoI. Biol. 48:443 (1970), através da pesquisa pelo método de semelhaça de Pearson & Lipman, Proc. Natl Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), através de implementações computorizadas destes

algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no pacote de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr. Madison, WI) ou através da inspecção visual (*ver, de um modo geral*, Ausubel *et al.*, *supra*). Um exemplo de algoritmo que é adequado para a determinação da percentagem de identidade de sequências e semelhaça de sequências é o algoritmo BLAST, o qual está descrito em Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990). O software para a realização das análises BLAST está disponível ao público através do National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) Tipicamente, podem ser utilizados os parâmetros do programa por defeito para realizar a comparação de sequências, ainda que possam também ser utilizados parâmetros personalizados. Para as sequências de aminoácidos, o programa BLASTP utiliza como base um comprimento de palavra (W) de 3, uma expectativa (E) de 10 e a matriz de pontuação BLOSUM62 (ver Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10915 (1989)).

Para fins de classificação das substituições de aminoácidos como conservadas ou não conservadas, os aminoácidos são agrupados como se segue: Grupo I (cadeias laterais hidrofóbicas) norleucina, met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadeias laterais hidrofílicas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadeias laterais acídicas): asp, glu; Grupo IV (cadeias laterais básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (resíduos que influenciam a orientação da cadeia): gly, pro; Grupo IV (cadeias laterais aromáticas): trp, tyr, phe. As substituições conservadas envolvem substituições entre aminoácidos na mesma classe. As substituições não conservadas constituem a troca de um membro de uma destas classes por um membro de uma outra.

Os agentes terapêuticos da invenção são, tipicamente,

substancialmente puros. Isto significa que um agente tem, pelo menos, 50% p/p (peso/peso) de pureza, assim como está substancialmente livre de proteínas interferentes e contaminantes. Por vezes, os agentes terão, pelo menos, 80% p/p e, de um modo mais preferido, pelo menos, 90 ou cerca de 95% p/p de pureza. No entanto, através da utilização de técnicas convencionais de purificação de proteínas, podem ser obtidos péptidos homogéneos com, pelo menos, 99% p/p de pureza.

A ligação específica entre duas entidades significa uma afinidade de, pelo menos, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9 ou 10^{10} M^{-1}. São preferidas afinidades superiores a 10^8 M^{-1}.

O termo "anticorpo" é utilizado para incluir anticorpos intactos. Opcionalmente, os anticorpos podem ser conjugados quimicamente ou expressos como proteínas de fusão com outras proteínas.

APP^{695}, APP^{751} e APP^{770} referem-se, respectivamente a polipéptidos longos com 695, 751 e 770 resíduos de aminoácidos codificados pelo gene APP humano. Ver Kang *et al.*, Nature 325, 773 (1987); Ponte *et al.*, Nature 331, 525 (1988); e Kitaguchi *et al.*, Nature 331, 530 (1988). Os aminoácidos dentro da proteína precursora amilóide humana (APP) são numerados de acordo com a sequência da isoforma APP770. Termos tais como Aβ39, Aβ40, Ap41, Aβ42 e Aβ43 referem-se a um péptido Aβ contendo os resíduos de aminoácidos 1-39, 1-40, 1-41, 1-42 e 1-43.

O termo "epítopo" ou "determinante antigénico" refere-se a um local num antigénio ao qual respondem as células B e/ou T. Os epítopos das células B podem ser formados a partir de aminoácidos contíguos ou aminoácidos não contíguos justapostos

pelo enrolamento terciário de uma proteína. Os epítopos formados a partir de aminoácidos contíguos são tipicamente mantidos quando expostos a solventes desnaturantes, enquanto que os epítopos formados por enrolamento terciário são tipicamente perdidos quando submetidos a tratamento com solventes desnaturantes. Um epítopo inclui, tipicamente, pelo menos, 3, e mais geralmente, pelo menos, 5 ou 8-10 aminoácidos numa conformação espacial única. Os métodos de determinação da conformação espacial de epítopos incluem, por exemplo, cristalografia de raios X e ressonância magnética nuclear bidimensional. Ver, *e. g.*, Epitop Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996). Os anticorpos que reconhecem o mesmo epítopo podem ser identificados num imunoensaio simples que demonstra a capacidade de um anticorpo para bloquear a ligação de um outro anticorpo a um antigénio alvo. As células T reconhecem epítopos contínuos de aproximadamente nove aminoácidos para as células CD8 ou cerca de 13-15 aminoácidos para as células CD4. As células T que reconhecem o epítopo podem ser identificadas por ensaios *in vitro* que medem a proliferação dependente de antigénio, conforme determinado pela incorporação de ^{3}H-timidina pelas células T estimuladas como resposta a um epítopo (Burke *et al.*, J. Inf. Dis. 170, 1110-19 (1994)), através da morte dependente de antigénio (ensaio de linfócitos T citotóxicos, Tigges *et al.*, J. Immunol. 156,3901-3910) ou através da secreção de citocinas.

O termo resposta "imunológica" ou "imune" é o desenvolvimento de uma resposta humoral benéfica (mediada por anticorpos) e/ou celular (mediada por células T específicas de antigénio ou seus produtos de secreção) dirigida contra um péptido amilóide num doente recipiente. Tal resposta pode ser uma resposta activa induzida pela administração de imunogénio ou

uma resposta passiva induzida pela administração de anticorpo ou de células T estimuladas. Uma resposta imunitária celular é induzida pela apresentação de epítopos polipeptídicos em associação com moléculas de MHC Classe I ou Classe II para activar células T $CD4^+$ auxiliadoras e/ou células T citotóxicas $CD8^+$ específicas do antigénio. A resposta pode também envolver activação de monócitos, macrófagos, células NK, basófilos, células dendíticas, astrócitos, células da microglia, eosinófilos ou outros componentes de imunidade inata. A presença de uma resposta imunológica mediada por células pode ser determinada através de ensaios de proliferação (células T $CD4^+$) ou ensaios de CTL (linfócitos T citotóxicos) (ver Burke, supra; Tigges, supra). As contribuições relativas das respostas humoral e celular para o efeito terapêutico de um imunogénio podem ser distinguidas isolando separadamente IgG e células T, de um animal singénico imunizado e medindo o efeito protector ou terapêutico num segundo indivíduo.

Um "agente imunogénico" ou "imunogénio" é capaz de induzir uma resposta imunológica contra ele próprio, aquando da administração a um doente, opcionalmente, em conjunto com um adjuvante.

O termo "polinucleótido nu" refere-se a um polinucleótido não complexado com materiais coloidais. Os polinucleótidos nus estão por vezes clonados num vector plasmídico.

O termo "adjuvante" refere-se a um composto que quando administrado em conjunto com um antigénio aumenta a resposta imunitária ao antigénio, mas quando administrado sozinho não origina uma resposta imunitária ao antigénio. Os adjuvantes podem aumentar uma resposta imunitária através de vários

mecanismos, incluindo o recrutamento de linfócitos, a estimulação de células B e T e a estimulação de macrófagos.

O termo “doente” inclui humanos e outros mamíferos que recebem tratamento profilático ou terapêutico.

Aβ desagregado ou monomérico significa unidades monoméricas solúveis do péptido Aβ. Um método para preparar Aβ monomérico é dissolver o péptido Aβ liofilizado em DMSO com sonicação. A solução resultante é centrifugada para remover quaisquer partículas não solúveis. O Aβ agregado é uma mistura de oligómeros em que as unidades monoméricas são mantidas em conjunto através de ligações não covalentes.

Composições ou métodos “compreendendo” um ou mais elementos referidos podem incluir outros elementos não especificamente referidos. Por exemplo, uma composição que compreende o péptido Aβ, inclui um péptido Aβ isolado e um péptido Aβ como um componente de uma sequência polipeptídica maior.

DESCRIÇÃO DETALHADA

I. Geral

A invenção proporciona composições farmacêuticas para utilização em métodos para o tratamento profilático e terapêutico de doenças caracterizadas pela acumulação de depósitos amilóides. Os depósitos amilóides compreendem um péptido agregado numa massa insolúvel. A natureza do péptido varia entre diferentes doenças mas, na maioria dos casos, o agregado tem uma estrutura em folha plissada β e cora com o

corante Vermelho de Congo. As doenças caracterizadas pelos depósitos amilóides incluem a doença de Alzheimer (AD), aquando do aparecimento tardio e precoce. Em ambas as doenças, o depósito amilóide compreende um péptido designado Aβ, o qual se acumula no cérebro de indivíduos afectados. Exemplos de algumas outras doenças caracterizadas pelos depósitos amilóides são amiloidose SAA, síndrome hereditário Islandês, mieloma múltiplo e encefalopatias espongiformes, incluindo a doença das vacas loucas, a doença de Creutzfeuld Jakob, o "scrapie" dos carneiros e a encefalopatia espongiforme da marta (ver Weissmann *et al.*, Curr. Opin. Neurobiol. 7, 695-700 (1997); Smits *et al.*, Veterinary Quaterly 19, 101-105 (1997); Nathanson *et al.*, Am. J. Epidemiol. 145, 959-969 (1997)). Nestas doenças, os péptidos formadores dos agregados são o péptido amilóide sérico A, cistatina C, cadeia leve kapa de IgG, respectivamente para os três primeiros, e a proteína do prião para os outros.

II. Agentes terapêuticos

1. Doença de Alzheimer

Os agentes terapêuticos para utilizar na presente invenção induzem uma resposta imunitária contra o péptido Aβ. Estes agentes são anticorpos IgG1 humanos reactivos contra o péptido Aβ. A indução de uma resposta imunitária é passiva, quando é administrado um anticorpo que se liga, ele próprio ao Aβ num doente.

Aβ, também conhecido como péptido β-amilóide ou péptido A4 (ver documento US 4666829; Glenner & Wong, Biochem Biophys. Res. Commun. 120, 1131 (1984)), é um péptido de 39-43 aminoácidos,

que é o principal componente de placas características da doença de Alzheimer. Aβ é gerado pelo processamento de uma proteína maior, APP, por duas enzimas, designadas secretases β e γ (ver Hardy, TINS 20, 154 (1997)). As mutações conhecidas em APP associadas à doença de Alzheimer ocorrem perto do local de clivagem pela secretase β ou γ, ou dentro de Aβ. Por exemplo, a posição 717 está próxima do local de clivagem de APP pela secretase γ quando do seu processamento para originar Aβ, e as posições 670/671 estão próximas do local de clivagem de APP pela secretase β. Pensa-se que as mutações causem doença AD por interacção com as reacções de clivagem através das quais se forma Aβ, de forma a aumentar a quantidade da forma de 42/43 aminoácidos de Aβ gerada.

Aβ tem a propriedade invulgar de poder fixar e activar as cascatas do complemento clássica e alternativa. Em particular, liga-se a Clq e finalmente a C3bi. Esta associação facilita a ligação a macrófagos conduzindo à activação de células B. Além disso, C3bi é posteriormente processada e, depois, liga-se a CR2 nas células B numa forma dependente de células T, conduzindo a um aumento de 10000 na activação destas células. Este mecanismo faz com que Aβ dê origem a uma resposta imunitária superior relativamente a outros antigénios.

O anticorpo da invenção pode ligar-se a qualquer uma das formas do péptido Aβ que ocorrem naturalmente e, particularmente as formas humanas (*i. e.*, Aβ39, Aβ40, Aβ41, Aβ42 ou Aβ43). As sequências destes péptidos e a sua relação com o precursor APP são ilustradas pela Fig. 1 de Hardy *et al.*, TINS 20, 155-158 (1977). Por exemplo, Aβ42 tem a sequência: H_2N-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gli-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-

Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-OH.

Aβ41, Aβ40 e Aβ39 diferem de Aβ42 pela omissão de Ala, Ala-Ile e Ala-Ile-Val, respectivamente, da extremidade C-terminal. Aβ43 difere de Aβ42 pela presença de um resíduo de treonina na extremidade C.

Os péptidos Aβ podem ser sintetizados através da síntese de péptidos em fase sólida ou da expressão recombinante, ou podem ser obtidos a partir de fontes naturais. Os sintetizadores automáticos de péptidos podem ser comprados a numerosos fornecedores, tal como Applied Biosystems, Foster City, Califórnia. A expressão recombinante pode ser em bactérias, tais como *E. coli*, leveduras, células de insecto ou células de mamífero. Os processos para a expressão recombinante estão descritos em Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (C.S.H.P. Press, NY 2ª ed., 1989). Algumas formas do péptido Aβ estão igualmente disponíveis comercialmente (*e. g.*, American Peptides Company, Inc., Sunnyvale, CA e Califórnia Peptide Research, Inc. Napa, CA).

Os agentes terapêuticos da invenção incluem anticorpos humanos IgG1 que se ligam especificamente a Aβ. Tais anticorpos podem ser monoclonais ou policlonais. Alguns destes anticorpos ligam-se especificamente à forma agregada de Aβ sem se ligarem à forma dissociada. Alguns ligam-se especificamente à forma dissociada sem se ligarem à forma agregada. Alguns ligam-se a ambas as formas, agregada e dissociada. A produção de anticorpos monoclonais não-humanos, *e. g.*, murinos ou ratos, pode ser efectuada por, por exemplo, imunizando o animal com Aβ. Ver Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (CSHP NY, 1988). Tal imunogénio pode ser obtido a partir de uma fonte natural,

por sintase peptídicas ou por expressão recombinante.

As formas humanizadas de anticorpos de murganhos podem ser geradas por ligação das regiões CDR de anticorpos não-humanos a regiões constantes humanas através de técnicas de ADN recombinante. Ver Queen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989) e documento WO 90/07861.

Os anticorpos humanos podem ser obtidos utilizando métodos de apresentação de fago. *Ver, e. g.*, Dower *et al.*, documento WO 91/17271; McCafferty *et al.*, documento WO 92/01047. Nestes métodos, são produzidas bibliotecas de fagos nas quais os membros apresentam diferentes anticorpos à sua superfície. Os anticorpos são normalmente apresentados como fragmentos de Fv ou Fab. Os anticorpos apresentados nos fagos com uma especificidade desejada são seleccionados por enriquecimento por afinidade ao Aβ ou seus fragmentos. Os anticorpos humanos contra Aβ podem também ser produzidos a partir de mamíferos transgénicos não humanos com transgenes codificando, pelo menos, um segmento do locus da imunoglobulina humana e um locus de imonoglobulina endógena inactivado. Ver, *e. g.*, Lonberg *et al.*, documento WO93/12227 (1993); Kucherlapati, documento WO 91/10741 (1991). Os anticorpos humanos podem ser seleccionados por experiências de ligação competitivas ou, de outra forma, como tendo a mesma especificidade pelo epitopo como um anticorpo de murganho particular. Tais anticorpos têm particularmente uma grande probabilidade de partilhar as propriedades funcionais úteis dos anticorpos do murganho. Os anticorpos policlonais humanos podem também ser proporcionados na forma de soro de humanos imunizados com um agente imunogénico. Opcionalmente, tais anticorpos policlonais podem ser concentrados por purificação de afinidade utilizando Aβ ou outro péptido amilóide como um reagente de

afinidade.

Os anticorpos humanos ou humanizados podem ser concebidos com uma região constante IgG, IgD, IgA e IgE e qualquer isotipo, incluindo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Os anticorpos podem ser expressos como tetrâmeros contendo duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, como cadeias pesadas separadas, cadeias leves, como Fab, Fab' F(ab')$_2$ e Fv ou como anticorpos de cadeia simples nos quais os domínios variáveis da cadeia leve e pesada estão ligados através de um espaçador. Os anticorpos da invenção são do isotipo IgG1 humano.

2. Outras Doenças

Os mesmos princípios ou outros análogos determinam a produção de agentes terapêuticos para o tratamento de outras doenças amiloidogénicas. No geral, os agentes referidos atrás para utilizar no tratamento da doença de Alzheimer podem também ser utilizados para o tratamento do aparecimento precoce da doença de Alzheimer associada à síndrome de Down. Na doença das vacas loucas, é utilizado péptido prião, fragmentos activos e análogos e anticorpos contra o péptido prião em vez do péptido Aβ, fragmentos activos, análogos e anticorpos contra o péptido Aβ no tratamento da doença de Alzheimer. No tratamento do mieloma múltiplo, é utilizada a cadeia leve da IgG e análogos e anticorpos do mesmo, e assim por diante noutras doenças.

III. Doentes Adequados para o Tratamento

Os doentes adequados para o tratamento incluem os indivíduos que estão em risco de doença mas sem sintomas, assim como doentes que apresentem sintomas. No caso da doença de Alzheimer, virtualmente qualquer um que esteja em risco de sofrer da doença de Alzheimer se viver o tempo suficiente. Deste modo, os presentes métodos podem ser administrados profilaticamente à população em geral sem qualquer avaliação do risco do doente. Os presentes métodos são especialmente úteis para os indivíduos que possuam um risco genético conhecido de doença de Alzheimer. Tais indivíduos incluem os que têm familiares que sofreram desta doença e aqueles cujo risco é determinado através da análise de marcadores genéticos ou bioquímicas. Os marcadores genéticos de risco contra a doença de Alzheimer incluem mutações no gene APP, particularmente mutações na posição 717 e nas posições 670 e 671 referidas como mutações Hardy e Swedish, respectivamente (ver Hardy, *TINS*, supra). Outros marcadores de risco são mutações nos genes da presenilina, PS1 e PS2 e ApoE4, história familiar de AD, hipercolesterolémia ou aterosclerose. Os indivíduos que actualmente sofrem da doença de Alzheimer podem ser reconhecidos pela demência característica, assim como pela presença de factores de risco atrás descritos. Além disso, uma série de testes de diagnóstico está disponível para identificação de indivíduos que possuam AD. Estes incluem medição dos níveis de tau e Aβ42 no CSF. Níveis elevados de tau e diminuição dos níveis de Aβ42 significam a presença de AD. Os indivíduos que sofram da doença de Alzheimer podem também ser diagnosticados por critérios de MMSE ou ADRDA como discutido na secção dos Exemplos.

Em doentes assintomáticos, o tratamento pode começar em qualquer idade (*e. g.*, 10, 20, 30). No entanto, normalmente, não é necessário começar o tratamento até o doente atingir os 40, 50, 60 ou 70 anos. Tipicamente, o tratamento inclui múltiplas dosagens ao longo de um período de tempo. O tratamento pode ser monitorizado testando as respostas de anticorpos ou de células T ou B activadas ao agente terapêutico (*e. g.*, péptido Aβ) ao longo do tempo. Se a resposta falhar, é indicada uma dosagem de reforço. No caso de potenciais doentes com síndrome de Down, o tratamento pode começar antes do nascimento, através da administração do agente terapêutico à mãe, ou pouco depois do nascimento.

IV. Regimes de Tratamento

Nas aplicações profiláticas, as composições farmacêuticas ou medicamentos são administrados a um doente susceptível a uma doença particular, ou de outra forma em risco de, numa quantidade suficiente para eliminar ou reduzir o risco ou retardar o estabelecimento da doença. Nas aplicações terapêuticas, composições ou medicamentos são administrados a um doente suspeito ou já a sofrer de tal doença numa quantidade suficiente para curar ou, pelo menos, interromper parcialmente, os sintomas da doença e suas complicações. Uma quantidade adequada para conseguir isto é definida como uma dose eficaz em termos terapêuticos ou farmacêuticos. Nos regimes profiláticos e terapêuticos, os agentes são, de um modo geral, administrados em várias dosagens até que uma resposta imunitária suficiente tenha sido atingida. Tipicamente, a resposta imunitária é monitorizada e são administradas dosagens repetidas se a resposta imunitária

começar a esvanecer-se.

Doses eficazes das composições da presente invenção, para o tratamento dos estados atrás descritos variam de acordo com muitos factores diferentes, incluindo meios de administração, local alvo, estado fisiológico do doente, se o doente é humano ou animal, outros medicamentos administrados e se o tratamento é profilático ou terapêutico. De um modo geral, o doente é um humano mas, em algumas doenças, tal como na doença das vacas loucas, o doente pode ser um mamífero não humano, tal como um bovino. As dosagens de tratamento necessitam de ser tituladas para optimizar a segurança e eficácia. A quantidade de imunogénio depende se é também administrado adjuvante, sendo necessárias doses mais elevadas na ausência de adjuvante. A quantidade de um imunogénio para administração por vezes varia entre 1 µg e 500 µg por doente e mais geralmente entre 5-500 µg por injecção para administração humana. Ocasionalmente, é utilizada uma dose mais elevada de 1-2 mg por injecção. Tipicamente, é utilizado cerca de 10, 20, 50 ou 100 µg por cada injecção no homem. O esquema das injecções pode variar significativamente entre uma vez por dia e uma vez por ano, até uma vez por década. No dia em que é administrada uma dosagem de imunogénio, a dosagem é superior a 1 µg/doente e, geralmente, superior a 10 µg/doente se o adjuvante for também administrado e superior a 10 µg/doente e geralmente superior a 100 µg/doente na ausência de adjuvante. Um regime típico consiste numa imunização seguida de injecções de reforço com intervalos de 6 semanas. Um outro regime consiste numa imunização seguida de injecções de reforço 1, 2 e 12 meses mais tarde. Um outro regime inclui uma injecção de dois em dois meses para o resto da vida. Como alternativa, as injecções de reforço podem ser dadas numa base irregular como indicado pela monitorização da resposta

imunitária. Para a imunização passiva com um anticorpo, as gamas de dosagem variam de cerca de 0,0001 a 100 mg/Kg e, mais geralmente, 0,01 a 5 mg/Kg do peso do corpo do hospedeiro.

Os agentes para indução de uma resposta imunitária podem ser administrados por via parentérica, tópica, oral, subcutânea, intraperitoneal, intranasal ou intramuscular para o tratamento profilático e/ou terapêutico. A via de administração mais comum é a subcutânea, ainda que outras possam ser igualmente eficazes. A segunda via mais comum é a injecção intramuscular. Este tipo de injecção é, de um modo típico, mais efectuado nos músculos do braço ou da perna. As injecções intravenosas assim como as injecções intraperitoneais, intra-arteriais, intracraniais ou intradérmicas são também eficazes na geração de uma resposta imunitária. Em alguns métodos os agentes podem ser injectados directamente num tecido particular onde se acumularam os depósitos.

Os agentes da invenção podem ser administrados, opcionalmente, em combinação com outros agentes que são, pelo menos, parcialmente eficazes no tratamento de doença amiloidogénica. No caso da síndrome de Alzheimer e de Down, em que os depósitos amilóides ocorrem no cérebro, os agentes da invenção podem igualmente ser administrados conjuntamente com outros agentes que aumentam a passagem dos agentes da invenção através da barreira hematocefálica.

Os anticorpos da invenção são muitas vezes administrados como composições farmacêuticas compreendendo um agente terapêutico activo, *i. e.*, e uma variedade de outros componentes farmaceuticamente aceitáveis. Ver Remington's Pharmaceutical Science (15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania,

1980). A forma preferida depende do modo de administração e da aplicação terapêutica pretendida. As composições podem também incluir, dependendo da formulação pretendida, veículos ou diluentes não tóxicos farmaceuticamente aceitáveis, que são definidos como veículos normalmente utilizados para formular composições farmacêuticas para administração animal ou humana. O diluente é seleccionado de forma a não afectar a actividade biológica da combinação. São exemplos de tais diluentes a água destilada, solução salina tamponado com fosfatos, soluções de Ringer, solução de dextrose e solução de Hank. Além disso, a composição farmacêutica ou formulação pode igualmente incluir outros veículos, adjuvantes ou estabilizadores não tóxicos, não terapêuticos e não imunogénicos e semelhantes. No entanto, alguns reagentes adequados para administração a animais, tais como adjuvante completo de Freund, não são tipicamente incluídos nas composições para utilização no homem.

As composições farmacêuticas podem também incluir macromoléculas grandes lentamente metabolizadas tais como, proteínas, polissacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos e copolímeros (tais como sepharose funcionalizada com látex, agarose, celulase e semelhantes), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos e agregados de lípidos (tais como gotículas de óleo ou lipossomas). Ainda, estes veículos podem funcionar como agentes imunoestimuladores (*i. e.*, adjuvantes).

Para administração parentérica, os agentes da invenção podem ser administrados como dosagens injectáveis de uma solução ou suspensão da substância, num diluente fisiologicamente aceitável, com um veículo farmacêutico que pode ser um líquido estéril, tais como água, óleos, solução salina, glicerol ou

etanol. Ainda, podem estar presentes nas composições substâncias auxiliares, tais como agentes molhantes ou emulsionantes, tensioactivos, substâncias tamponantes do pH e semelhantes. Outros componentes das composições farmacêuticas são os óleos de petróleo, de origem animal, vegetal ou sintética, por exemplo, óleo de amendoim, óleo de soja e óleo mineral. Em geral, os glicóis, tais como propilenoglicol ou polietilenoglicol são veículos líquidos preferidos, particularmente para soluções injectáveis.

Tipicamente, as composições são preparadas como injectáveis, soluções ou suspensões líquidas; podem ser igualmente preparadas formas sólidas adequadas para preparar a solução ou a suspensão em veículos líquidos antes da injecção. A preparação pode também ser emulsionada ou encapsulada em lipossomas ou micropartículas, tais como polilactido, poliglicólido ou copolímeros para aumentar o efeito do adjuvante, como discutido acima (ver Langer, Science 249, 1527 (1990) e Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28, 97-119 (1997). Os agentes desta invenção podem ser administrados na forma de uma injecção com depósito ou como preparação de implante, que pode ser formulada de forma a permitir uma libertação sustida ou pulsada do ingrediente activo.

Formulações adicionais adequadas para outros modos de administração incluem formulações orais, intranasais e pulmonares, supositórios e aplicações transdérmicas.

Para supositórios, os agentes de ligação e veículos incluem, por exemplo, polialquilenoglicóis ou triglicéridos; tais supositórios podem ser formados a partir de misturas contendo o ingrediente activo na gama de 0,5% a 10%, de um modo

preferido, 1%-2%. As formulações orais incluem excipientes, tais como graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, celulose e carbonato de magnésio. Estas composições podem tomar a forma de soluções, suspensões, comprimidos, pílulas, cápsulas, formulações de libertação controlada ou pós e contêm 10%-95% de ingrediente activo, de um modo preferido, 25%-70%.

A aplicação tópica pode resultar em libertação transdérmica ou intradérmica. A administração tópica pode ser facilitada através de co-administração do agente com toxina da cólera ou derivados sem toxina ou suas subunidades ou outras toxinas bacterianas semelhantes (Ver Glenn *et al.*, Nature 391,851 (1998)). A co-administração pode ser conseguida utilizando os componentes como uma mistura ou como moléculas ligadas obtidas por reticulação química ou expressão como uma proteína de fusão.

Como alternativa, a libertação transdérmica pode ser conseguida utilizando um penso dérmico ou utilizando transfersomas (Paul *et al.*, Eur. J. Immunol. 25, 3521-24 (1995); Cevc *et al.*, Biochem. Biophys. Acta 1368, 201-15 (1998)).

V. Diagnóstico

A divulgação proporciona métodos de detecção de uma resposta imunitária contra o péptido Aβ num doente que sofra ou seja susceptível à doença de Alzheimer. Os métodos são particularmente úteis para a monitorização do curso de um tratamento a ser administrado a um doente. Os métodos podem ser utilizados para monitorizar o tratamento terapêutico em doentes sintomáticos e o tratamento profilático em doentes

assintomáticos.

Alguns métodos englobam a determinação de um valor da linha de base, de uma resposta imunitária num doente, antes da administração de uma dosagem de um agente e comparação deste com um valor para a resposta imunitária após o tratamento. Um aumento significativo (*i. e.*, superior à margem típica de erro experimental em medições repetidas na mesma amostra, expresso como um desvio padrão da média de tais medições) no valor da resposta imunitária indicia um desfecho positivo para o tratamento (*i. e.*, que a administração do agente induziu ou aumentou uma resposta imunitária). Se o valor da resposta imunitária não alterar significativamente ou diminuir, é indicativo de um desfecho negativo para o tratamento. Em geral, espera-se que os doentes que passem por um curso inicial de tratamento com um agente apresentem um aumento da resposta imunitária com dosagens sucessivas que, eventualmente, atinge um patamar. A administração do agente é, de um modo geral, continuada durante o aumento da resposta imunitária. O atingir do patamar é um indicador de que o tratamento administrado pode ser descontinuado ou reduzido na dosagem ou frequência.

Noutros métodos, um valor de controlo (*i. e.*, uma média e desvio padrão) da resposta imunitária é determinado para uma população de controlo. Tipicamente, os indivíduos na população de controlo não receberam qualquer tratamento anterior. Os valores da resposta imunitária medidos num doente após administração de um agente terapêutico são então comparados com o valor de controlo. Um aumento significativo relativamente ao valor de controlo (*e. g.*, superior a um desvio padrão da média) indicia um desfecho positivo para o tratamento. A não observação de um aumento significativo ou de um decréscimo sugere um

desfecho negativo para o tratamento. A administração do agente é, de um modo geral, continuada enquanto a resposta imunitária cresce relativamente ao valor do controlo. Como anteriormente, o atingir de um patamar relativamente aos valores de controlo é um indicador de que a administração do tratamento pode ser descontinuada ou reduzida na dosagem ou frequência.

Noutros métodos, um valor de controlo da resposta imunitária (*e. g.*, uma média e desvio padrão) foi determinado a partir de uma população de controlo de indivíduos que foram submetidos a tratamento com um agente terapêutico e cujas respostas imunitárias atingiram um patamar de resposta ao tratamento. Os valores medidos da resposta imunitária num doente são comparados com o valor de controlo. Se o nível medido num doente não for significativamente diferente *e. g.*, mais de um desvio padrão) do valor de controlo, o tratamento pode ser descontinuado. Se o nível num doente for significativamente abaixo do valor de controlo, é assegurada administração continuada do agente. Se o nível no doente persistir abaixo do valor de controlo, então pode ser indicada uma alteração no regime de tratamento, por exemplo, a utilização de um adjuvante.

Noutros métodos, um doente que não esteja a receber tratamento mas que tenha sido submetido a um tratamento é monitorizado relativamente à resposta imunitária para determinar se é necessário recomeçar o tratamento. O valor da resposta imunitária medido no doente pode ser comparado com um valor de resposta imunitária previamente atingido no doente após um tratamento anterior. Um decréscimo significativo relativamente à medição anterior (*i. e.*, superior a uma margem de erro típica em medições repetidas da mesma amostra) é uma indicação que o tratamento pode ser retomado. Como alternativa, o valor medido

no doente pode ser comparado com um valor de controlo (média mais desvio padrão) determinado na população de doentes após o tratamento. Como alternativa, o valor medido num doente pode ser comparado com um valor de controlo em populações de doentes tratados profilaticamente que permanecem sem sintomas de doença ou em populações de doentes tratados terapeuticamente que apresentem melhoria das características da doença. Em todos estes casos, um decréscimo significativo relativamente ao nível do controlo (*i. e.*, mais do que o desvio padrão) é um indicador de que o tratamento deverá ser retomado num doente.

A amostra de tecido para análise é tipicamente sangue, plasma, soro, muco ou fluido cerebroespinal do doente. A amostra é analisada relativamente a indícios de uma resposta imunitária contra qualquer forma de péptido Aβ, tipicamente Aβ42. A resposta imunitária pode ser determinada a partir da presença de *e. g.*, anticorpos ou células T que se ligam especificamente ao péptido Aβ. OS métodos de ELISA para a detecção de anticorpos específicos contra Aβ estão descritos na secção dos Exemplos. Os métodos de detecção de células T reactivas foram descritos atrás (ver Definições).

EXEMPLOS

I. Eficácia Profilática de Aβ Contra AD

Estes exemplos descrevem a administração do péptido Aβ42 a murganhos transgénicos que sobreexpressam APP com uma mutação na posição 717 ($APP_{717V\rightarrow F}$) que os predispõe para desenvolver neuropatologia do tipo Alzheimer. A produção e características destes murganhos (murganhos PDAPP) estão descritas em Games

et al., Nature, *supra*. Estes animais, na sua forma heterozigótica, começam a depositar Aβ dos seis meses de idade em diante. Aos quinze meses de idade apresentam níveis de deposição de Aβ equivalente ao observado na doença de Alzheimer. Os murganhos PDAPP foram injectados com $A\beta_{42}$ agregada ($A\beta_{42}$ agregada) ou solução salina tamponado com fosfatos. O $A\beta_{42}$ agregado foi escolhido devido à sua capacidade para induzir anticorpos contra múltiplos epítopos de Aβ.

A. Métodos

1. Fonte de murganhos

Trinta murganhos fêmea PADPP heterogénicos foram divididos aleatoriamente pelos seguintes grupos: 10 murganhos para serem injectados com $A\beta_{42}$ agregado (um morreu em trânsito), 5 murganhos para serem injectados com PBS/adjuvante ou PBS e 10 para controlos não injectados. Cinco murganhos foram injectados com proteína amilóide do soro (SAP).

2. Preparação de imunogénios

Preparação de $A\beta_{42}$ agregado: duas miligramas de $A\beta_{42}$ (US Peptides Inc., lote K-42-12) foram dissolvidas em 0,9 mL de água e ajustadas a 1 mL pela adição de 0,1 mL de PBS 10X. Isto foi agitado com vórtex e deixado a incubar, de um dia para o outro, a 37 °C, condições em que o péptido agregou. Qualquer Aβ não utilizado foi guardado como pó seco liofilizado a -20 °C até à injecção seguinte.

3. Preparação de injecções

Foram emulsionadas 100 µg de $A\beta_{42}$ agregado em PBS por murganho a 1:1 com adjuvante completo de Freund (CFA) num volume final de 400 µL de emulsão para a primeira imunização, seguido de um reforço da mesma quantidade de imunogénio em adjuvante incompleto de Freund (IFA) às 2 semanas. Duas doses adicionais em IFA foram administradas com intervalos mensais. As imunizações subsequentes foram feitas com intervalos mensais em 500 µL de PBS. As injecções foram administradas intaperitonealmente (i.p.)

As injecções de PBS seguiram o mesmo esquema e os murganhos foram injectados com uma mistura a 1:1 de PBS/adjuvante a 400 µL por murganho, ou a 500 µL de PBS por murganho. As injecções SAP seguiram igualmente o mesmo esquema utilizando uma dose de 100 µL por injecção.

4. Titulação de Colheitas de Sangue de Murganho, Preparação de Tecido e Imuno-histoquímica

Os métodos atrás referidos estão descritos abaixo em Materiais e Métodos Gerais.

B. Resultados

Os murganhos PDAPP foram injectados com $A\beta_{42}$ agregado ($A\beta_{42}$ agregado), péptidos SAP ou solução salina tamponado com fosfatos. Um grupo de murganhos PDAPP foi também deixado como

controlo positivo não injectado. Os títulos dos murganhos contra o AB_{42} agregado foram monitorizados mês sim mês não, a partir do quarto reforço, até os murganhos terem um ano de idade. Os murganhos foram sacrificados aos treze meses. Em todos os pontos do tempo analisados, oito dos nove murganhos que receberam AB_{42} agregado desenvolveram um título de anticorpos elevado, o qual permaneceu elevado ao longo da série de injecções (títulos superiores a 1/10000). O nono murganho tinha um título baixo mas mensurável de aproximadamente 1/1000 (Figura 1, Tabela 1). Os murganhos injectados com SAPP tiveram títulos de 1:1000 a 1:30000 contra este imunogénio com apenas um murganho excedendo 1:10000.

Os murganhos tratados com PBS foram titulados contra $A\beta_{42}$ agregado aos seis, dez e doze meses. Numa diluição de 1/100 os murganhos que receberam PBS, quando titulados contra AB_{42} agregado, apenas excederam 4 vezes o fundo num ponto de tempo, sendo sempre inferior a 4 vezes o fundo nos restantes pontos do tempo (Tabela 1). A resposta específica de SAP foi negligível nestes pontos com todos os títulos inferiores a 300.

Sete de nove murganhos no grupo de AB_{42} agregado não tinham amilóide detectável nos seus cérebros. Pelo contrário, o tecido do cérebro dos murganhos nos grupos SAP e PBS continham numerosos depósitos amilóides positivos para 3D6 no hipocampo, assim como nos córtex frontal e cingulato. O padrão de deposição foi semelhante ao dos controlos não tratados, com envolvimento característico de sub-regiões vulneráveis, tais como a camada molecular externa do giro dentado do hipocampo. Um murganho do grupo injectado com Aβ 1-42 tinha um desenvolvimento amilóide grandemente reduzido, confinado ao hipocampo. Uma placa isolada foi identificada num outro murganho tratado com Aβ 1-42.

Análises quantitativas de imagens do desenvolvimento amilóide no hipocampo confirmaram a dramática redução conseguida nos animais tratados com AN1792 (Fig. 2). Os valores médios do desenvolvimento amilóide para o grupo do PBS (2,22%) e para o grupo controlo não tratado (2,65%) foram significativamente superiores do que para os imunizados com AN1792 (0,00%, p=0,0005). Pelo contrário, o valor médio do grupo imunizado com péptidos SAP (SAPP) foi de 5,74%. O tecido cerebral dos murganhos de controlo não tratados continha numerosos depósitos amilóides Aβ, visualizados com o anticorpo monoclonal específico de Aβ (mAb) 3D6, no hipocampo assim como no córtex retroesplenial. Um padrão semelhante de deposição amilóide foi igualmente observado em murganhos imunizados com SAPP ou PBS (Fig. 2). Além disso, nestes três últimos grupos, houve um envolvimento característico de sub-regiões vulneráveis do cérebro classicamente observado em AD, tal como a camada molecular externa do giro dentado do hipocampo, na totalidade destes três grupos.

Os cérebros que não continham depósitos de Aβ também não possuíam placas neuríticas que são tipicamente visualizadas em murganhos PDAPP com o anticorpo 8ES contra APP humano. Todos os cérebros dos restantes grupos (murganhos injectados com SAP, PBS e não injectados) tinham numerosas placas neuríticas, típicas de murganhos PDAPP não tratados. Um pequeno número de placas neuríticas estava presente num murganho tratado com AN1792 e foi encontrado um único grupo de neurites distróficas num segundo murganho tratado com AN1792. As análises de imagens do hipocampo e mostradas na Fig. 3, demonstraram a eliminação virtual de neurites distróficas em murganhos tratados com AN1792 (média 0,00%) comparativamente com os que receberam PBS (média 0,28%,

p=0,0005)

A astrocitose característica de inflamação associada a placas também estava ausente nos cérebros do grupo injectado com Aβ1-42. O cérebro dos murganhos nos outros grupos continha astrócitos positivos para GFAP abundantes e agrupados típicos de gliose associada a placas Aβ. Uma subsérie de lâminas que reagiram com GFAP foi contrastada com Tioflavina S para localizar os depósitos de Aβ. Os astrócitos positivos para GFAP foram associados a placas Aβ nos murganhos de SAP, PBS e controlos não tratados. Não foi encontrada esta associação nos murganhos tratados com Aβ1-42 negativos relativamente a placas, enquanto foi identificada gliose mínima associada a placas num murganho tratado com AN1792.

As análises de imagens, mostradas na Fig. 4 para o córtex retroesplenial, confirmaram que a redução de astrocitose foi significativa, com um valor médio de 1,56% para os murganhos tratados com AN1792 *versus* valores médios superiores a 6% para grupos imunizados com péptidos SAP, PBS ou não tratados (p=0,0017).

Resultados de uma subsérie dos murganhos injectados com Aβ1-42 e com PBS indicaram ausência de imuno-reactividade MHC II associada às placas nos murganhos injectados com Aβ1-42, consistente com ausência de uma resposta inflamatória relacionada com Aβ.

As secções de cérebros de murganhos também foram reagidas com um mAβ específico de MAC-1, uma proteína da superfície celular. MAC-1 (CD11b) é um membro da família das integrinas e existe como um heterodímero com CD18. O complexo CD11b/CD18 está

presente em monócitos, macrófagos, neutrófilos e células assassinas naturais (Mak e Simard).O tipo de células residente reactivo para MAC-1 é provavelmente a microglia, com base em morfologia fenotípica semelhante nas secções que apresentam reactividade imunológica com MAC-1. A marcação de MAC-1 associada a placas foi mais baixa nos cérebros de murganhos tratados com AN1792 comparativamente com o grupo de controlo que recebeu PBS, um resultado consistente com a ausência de uma resposta inflamatória induzida por Aβ.

C. Conclusão

A ausência de placas Aβ e as alterações de reactividade neuronal e gliótica nos cérebros de murganhos injectados com Aβ1-42 indicam que nenhuma, ou extremamente pouca, amilóide foi depositada nos seus cérebros e a ausência de consequências patológicas, tais como gliose e patologia neurítica. Os murganhos PDAPP tratados com Aβ1-42 apresentaram essencialmente a mesma ausência de patologia dos murganhos de controlo não transgénicos. Assim, as injecções de Aβ1-42 foram altamente eficazes na prevenção da deposição ou eliminação de Aβ humano do tecido cerebral e na eliminação de subsequentes alterações degenerativas neuronais e inflamatórias. Assim, a administração do péptido Aβ apresenta benefício terapêutico na prevenção de AD.

II. Estudo da Resposta à Dose

Grupos de murganhos Swiss Webster, fêmeas, com cinco semanas de idade (n=6 por grupo) foram imunizados com 300, 100,

33, 11, 3,7, 1,2, 0,4 ou 0,13 µg de Aβ formulado em CFA/IFA e administrado intraperitonealmente. Foram dadas três doses com intervalos de duas semanas, seguido de uma quarta dose um mês mais tarde. A primeira dose foi emulsionada com CFA e as restantes doses foram emulsionadas com IFA. Os animais foram sangrados 4-7 dias após cada imunização começando após a segunda dose para medição dos títulos de anticorpos. Os animais numa subsérie de três grupos, imunizados com 11, 33 ou 300 µg de antigénio, foram ainda submetidos a colheitas de sangue, aproximadamente com intervalos mensais, durante quatro meses após a quarta imunização para monitorizar o decaimento da resposta de anticorpos para uma série de doses de vacina. Estes animais receberam uma quinta imunização final aos sete meses após o início do estudo. Os animais foram sacrificados uma semana mais tarde para medir as respostas de anticorpos contra AN1792 e para realizar análises toxicológicas.

Uma dose resposta proporcional foi observada a partir de 300 até 3,7 µg sem qualquer resposta nas duas doses mais baixas. A média dos títulos de anticorpos é cerca de 1:1000 após 3 doses e cerca de 1:10000 após 4 doses de 11-300 µg de antigénio (ver Fig. 5)

Os títulos de anticorpos subiram dramaticamente para todos os grupos, exceptuando o grupo da dose mais baixa, após a terceira imunização com GMT crescentes, variando entre 5 e 25 vezes. Respostas baixas de anticorpos foram então detectáveis mesmo nos animais que receberam 0,4 µg. Os grupos que receberam 1,2 e 3,7 µg tiveram títulos comparáveis com GMT de aproximadamente 1000 e as quatro doses mais elevadas formaram um grupo com GMT de aproximadamente 25000, com excepção do grupo da dose de 33 µg com um GMT mais baixo de 3000. Após a quarta

imunização, o aumento de título foi mais modesto para a maioria dos grupos. Houve uma clara dose resposta nos grupos com doses de antigénio mais baixas entre 0,14 µg e 11 µg variando entre anticorpo não detectável para os recipientes de 0,14 µg até uma GMT de 36000 para os recipientes de 11 µg. Novamente, os títulos para os quatro grupos com doses mais elevadas de 11 a 300 µg formaram um conjunto. Assim, após duas imunizações, o título de anticorpos mostrou-se dependente da dose de antigénio ao longo da gama larga entre 0,4 e 300 µg. Quando da terceira imunização, os títulos das quatro doses mais elevadas eram todos comparáveis e permaneceram num patamar após mais uma imunização.

Um mês após a quarta imunização, os títulos foram 2 a 3 vezes mais elevados no grupo das 300 µg do que os medidos no sangue colhido cinco dias após a imunização (Fig. 6). Esta observação sugere que o pico de resposta anamnéstica de anticorpos ocorreu mais tarde do que 5 dias pós-imunização. Um aumento mais modesto (50%) foi observado nesta altura no grupo das 33 µg. No grupo da dose de 300 µg aos dois meses após a última dose, os GMT baixaram abruptamente em cerca de 70%. Após mais um mês, o declínio foi menos acentuado sendo de 45% (100 µg) e cerca de 14% para as doses de 33 e 11 µg. Assim, a velocidade de diminuição dos títulos de anticorpos circulantes, após cessação da imunização, parece ser bifásico com um declínio abrupto no primeiro mês após o pico da resposta, seguido de um decréscimo a uma velocidade mais modesta a partir de então.

Os títulos de anticorpos e as cinéticas da resposta destes murganhos Swiss Webster são semelhantes aos de murganhos transgénicos PDAPP heterozigóticos jovens imunizados de forma semelhante. As dosagens eficazes para induzir uma resposta imunitária em humanos são tipicamente semelhantes às dosagens

eficazes em murganhos.

III. Rastreio da Eficácia Terapêutica Contra AD Estabelecida

Este ensaio foi desenhado para testar agentes imunogénicos relativamente à actividade na interrupção ou reversão das características neuropatológicas de AD em animais idosos. As imunizações com Aβ de 42 aminoácidos de comprimento (AN1792) começaram quando as placas amilóides já estavam presentes nos cérebros dos murganhos PDAPP.

Durante este estudo, os murganhos PDAPP não tratados desenvolveram uma série de alterações neurodegenerativas que se assemelhavam às encontradas em AD (Games *et al.*, *supra* e Johnson-Wood *et al.*, Proc. Natl, Acad. Sci. USA 94, 1550-1555 (1997)). A deposição de Aβ em placas amilóides está associada a uma resposta neuronal degenerativa consistindo em elementos axonais e dendríticos aberrantes, designadas neurites distróficas. Os depósitos amilóides que estão rodeados e contêm neurites distróficas são designados placas neuríticas. Tanto em AD como em murganhos PDAPP, as neurites distróficas possuem uma estrutura globular distinta, são imuno-reactivas com um painel de anticorpos que reconhecem APP e componentes do citosqueleto e apresentam alterações degenerativas subcelulares complexas ao nível ultra-estrutural. Estas características permitem medições selectivas e reprodutíveis, importantes para a doença, da formação de placas neuríticas nos cérebros PDAPP. O componente neuronal distrófico das placas neuríticas PDAPP é facilmente visualizado com um anticorpo específico de APP humano (mAβ 8E5) e é facilmente mensurável através da análise de imagens

auxiliada por computador. Assim, além da medição dos efeitos de AN1792 na formação de placas amilóides, monitorizou-se os efeitos deste tratamento no desenvolvimento de distrofia neurítica.

Os astrócitos e microglia são células não neuronais que respondem e reflectem o grau de lesão neuronal. Astrócitos GFAP-positivos e microglia positiva para MHC II são normalmente observadas em AD e a sua activação aumenta com a gravidade da doença. Assim, também se controlou o desenvolvimento de astrocitose e microgliose reactiva nos murganhos tratados com AN1792.

A. Materiais e métodos

Quarenta e oito murganhos PDAPP fêmeas, heterozigóticos, com 11 a 11,5 meses de idade, obtidos à Charles River, foram divididos aleatoriamente em dois grupos: 24 murganhos para serem imunizados com 100 µg de AN1792 e 24 murganhos para serem imunizados com 100 µg PBS, cada um combinado com adjuvante de Freund. Os grupos de AN1792 e de PBS foram novamente divididos quando atingiram aproximadamente 15 meses de idade. Aos quinze meses de idade aproximadamente metade de cada grupo dos animais tratados com AN1792 e PBS foram eutanasiados (n = 10 e 9, respectivamente), os restantes continuaram a receber imunizações até ao final de ~ 18 meses (n = 9 e 12, respectivamente). Um total de 8 animais (5 AN1792, 3 PBS) morreu durante o estudo. Além dos animais imunizados, murganhos PDAPP com um ano de idade (n = 10), 15 meses (n = 10) e 18 meses (n = 10) não tratados foram incluídos para comparação nos ELISA para medir os níveis de Aβ e APP no cérebro; os animais com um ano de idade foram

igualmente incluídos nas análises imuno-histoquímicas.

A metodologia foi a como no Exemplo 1, a menos que indicado de outro modo. Péptidos US lote 12 e Péptidos California lote ME0339 de AN1792 foram utilizados para preparar o antigénio para as seis imunizações administradas antes dos 15 meses. Os péptidos California lotes ME0339 e ME0439 foram utilizados nas três imunizações adicionais administradas entre os 15 e os 18 meses.

Para as imunizações, 100 µg de AN1792 em 200 µL de PBS ou PBS sozinho foi emulsionado a 1:1 (vol:vol) com adjuvante completo de Freund (CFA) ou adjuvante incompleto de Freund (IFA) ou PBS num volume final de 400 µL. A primeira imunização foi administrada com CFA como adjuvante, as quatro doses seguintes foram administradas com IFA e as quatro doses finais com PBS sozinho sem adjuvante adicionado. Um total de nove imunizações foi administrado ao longo do período de sete meses num esquema bi-semanal durante as primeiras três doses, seguido de um intervalo de quatro semanas para as restantes injecções. O grupo de quatro meses de tratamento foi eutanizado aos 15 meses de idade, recebeu apenas as 6 primeiras imunizações.

B. Resultados

1. Efeitos do Tratamento com AN1792 no Desenvolvimento Amilóide

Os resultados do tratamento com AN1792 no desenvolvimento amilóide cortical determinados pela análise quantitativa de imagens são mostrados na Fig. 7. O valor médio do

desenvolvimento cortical foi de 0,28% num grupo de murganhos PDAPP de 12 meses de idade não tratado, um valor representativo da carga de placas presentes nos murganhos no início do estudo. Aos 18 meses, o desenvolvimento amilóide aumentou mais de 17 vezes até 4,87% em murganhos tratados com PBS, enquanto que os murganhos tratados com AN1792 tiveram um desenvolvimento amilóide grandemente reduzido de apenas 0,01%, notoriamente inferior aos grupos de 12 meses não tratados e aos grupos de 15 e 18 meses tratados com PBS. O desenvolvimento amilóide foi significativamente reduzido nos recipientes de AN1792 aos 15 (96% de redução; p=0,003) e aos 18 meses (>99% de redução; p=0,0002).

Tipicamente a deposição amilóide cortical em murganhos PDAPP inicia-se nos córtexes frontal e retroesplenial (RSC) e progride numa direcção ventral-lateral para envolver os córtexes temporal e entorrinal (EC). Pouco ou nenhum amilóide é encontrado no EC dos murganhos com 12 meses de idade, a idade aproximada a que AN1792 foi primeiro administrado. Após 4 meses de tratamento com AN1792, a deposição amilóide foi grandemente diminuída no RSC e o envolvimento progressivo do EC foi totalmente eliminado pelo tratamento com AN1792. Esta última observação mostrou que AN1792 parou a progressão amilóide que normalmente invadiria os córtexes temporal e ventral, assim como parou ou possivelmente reverteu a deposição no RSC.

Os efeitos profundos do tratamento com AN1792 no desenvolvimento amilóide cortical nos murganhos PDAPP foram ainda demonstrados pelo grupo de 18 meses de idade, o qual foi tratado durante sete meses. Uma ausência quase completa de amilóide cortical foi encontrado no murganho tratado com AN1792, com uma ausência total de placas difusas, assim como uma redução

nos depósitos compactados.

2. Alterações Celulares e Morfológicas Associadas ao Tratamento com AN1792

Uma população de células positivas para Aβ foi encontrada nas regiões cerebrais que contêm tipicamente depósitos amilóides. É notável que, em vários cérebros de recipientes de AN1792, foram encontradas muito poucas ou nenhumas placas amilóides corticais extracelulares. A maioria da imuno-reactividade com Aβ parecia estar dentro das células com grandes corpos lobulares ou agregados. Fenotipicamente, estas células assemelham-se a microglia ou a monócitos activados. Elas foram imuno-reactivas com anticorpos que reconhecem ligandos expressos pelos monócitos e microglia activados (MHC II e CD11b) e foram ocasionalmente associados à parede ou ao lumén dos vasos sanguíneos. A comparação de secções quase adjacentes marcadas com anticorpos específicos de Aβ e de MHC II revelaram padrões semelhantes destas células que foram reconhecidas por ambas as classes de anticorpos. A análise detalhada dos cérebros tratados com AN1792 revelou que as células positivas para MHC II estavam restringidas à vizinhança da amilóide limitada que restava nestes animais. Nestas condições de fixação empregues, as células não foram imuno-reactivas com anticorpos que reconhecem os ligandos das células T (CD3, CD3e) ou das células B (CD45RA, CD45RB) ou o antigénio comum de leucócitos (CD45), mas foram reactivos com um anticorpo que reconhece leucossialina (CD43) que dá reacção cruzada com monócitos. Não foram encontradas estas células em qualquer dos murganhos tratados com PBS.

Os murganhos PDAPP invariavelmente desenvolveram fortes

depósitos amilóides na camada molecular externa do giro dentado do hipocampo. Os depósitos formam um riscado distinto dentro da via perforante, uma sub-região que classicamente contém placas amilóides em AD. O aspecto característico destes depósitos em murganhos tratados com PBS assemelhou-se ao previamente caracterizado em murganhos PDAPP não tratados. A deposição amilóide consistiu em placas difusas e compactas numa banda contínua. Pelo contrário, numa série de cérebros de murganhos tratados com AN1792 este padrão foi drasticamente alterado. A deposição amilóide no hipocampo deixou de conter amilóides difusas e o padrão em banda foi completamente destruído. Pelo contrário, estava presente uma série de estruturas pontuadas reactivas com anticorpos anti-Aβ, várias delas surgiram como células contendo amilóides.

Células positivas para MHC II foram frequentemente observadas na vizinhança de amilóide extracelular em animais tratados com AN1792. O padrão de associação de células positivas para Aβ com amilóide foi muito semelhante em vários cérebros de murganhos tratados com AN1792. A distribuição destas células monocíticas foi restringida à proximidade do amilóide depositado e estava totalmente ausente das regiões do cérebro sem placas Aβ.

A análise quantitativa de imagens de secções marcadas para MHC II e MAC I revelou uma tendência no sentido do aumento da imuno-reactividade no RSC e hipocampo de murganhos tratados com AN1792, comparativamente com o grupo que recebeu PBS, o qual atingiu significância com a medição da reactividade de MAC-1 no hipocampo.

Estes resultados são um indicador de remoção activa,

mediada por células, do amilóide nas regiões do cérebro com placas.

3. Efeitos de AN1792 nos Níveis de Aβ: Determinações por ELISA

(a) Níveis Corticais

Em murganhos PDAPP não tratados, o nível médio de Aβ total no córtex aos 12 meses foi de 1600 ng/g, que aumentou para 8,700 ng/g aos 15 meses (Tabela 2). Aos 18 meses o valor foi de 22000 ng/g, um aumento superior a 10 vezes durante a experiência. Os animais tratados com PBS tinham 8600 ng/g de Aβ total aos 15 meses que aumentou para 19000 ng/g aos 18 meses. Pelo contrário, os animais tratados com AN1792 tiveram 81% menos Aβ total aos 15 meses (1600 ng/g) do que o grupo imunizado com PBS. Significativamente menos (p=0,0001) Aβ total (5200 ng/g) foi encontrado aos 18 meses quando os grupos AN1792 e PBS foram comparados (Tabela 2), representando uma redução de 72% em que de outra forma estaria presente. Resultados semelhantes foram obtidos quando os níveis corticais de Aβ foram comparados, nomeadamente o grupo tratado com AN1792 continha muito menos Aβ42, mas neste caso as diferenças entre os grupos AN1792 e PBS foram significativos aos 15 meses (p=0,04) e aos 18 meses (p=0,0001, Tabela 2).

Tabela 2: Níveis médios de Aβ (ng/g) no córtex

NÃO TRATADO				PBS			AN1792		
Idade	**Aβ Total**	**Aβ42**	**(n)**	**Aβ Total**	**Aβ42**	**(n)**	**Total**	**Aβ42**	**(n)**
12	1600	1300	(10)						
15	8700	8300	(10)	8600	7200	(9)	1600	1300*	(10)
18	22200	18500	(10)	19000	15900	(12)	5200**	4000**	(9)
									*p = 0,0412
									**p = 0,0001

(b) Níveis do Hipocampo

Nos murganhos PDAPP não tratados, os níveis médios no hipocampo de Aβ total, aos doze meses de idade, foram 15000 ng/g que aumentou para 51000 ng/g aos 15 meses e para 81000 ng/g aos 18 meses (Tabela 3). De forma semelhante, os murganhos imunizados com PBS apresentaram valores de 40000 ng/g aos 15 meses e aos 18 meses, respectivamente. Os animais imunizados com AN1792 apresentaram menos Aβ total, especificamente 25000 ng/g e 51000 ng/g aos 15 e 18 meses respectivamente. Aos 18 meses o valor do grupo tratado com AN1792 foi significativamente inferior ao do grupo tratado com PBS (p=0,0105; Tabela 3). A medição de Aβ42 deu o mesmo padrão de resultados, nomeadamente os níveis no grupo tratado com AN1792 foram significativamente inferiores ao grupo de PBS (39000 ng/g *vs* 57000 ng/g, respectivamente; p=0,0022) aos 18 meses de avaliação (Tabela 3).

Tabela 3: Níveis médios de Aβ (ng/g) no hipocampo

NÃO TRATADO				PBS			AN1792		
Idade	**Aβ total**	**Aβ42**	**(n)**	**Aβ total**	**Aβ42**	**(n)**	**Total**	**Aβ42**	**(n)**
12	15500	11100	(10)						
15	51500	44400	(10)	40100	35700	(9)	24500	22100*	(10)
18	80800	64200	(10)	65400	57100	(12)	50900*	38900**	(9)
									*p = 0,0105
									**p = 0,0022

(c) Níveis Cerebelares

Aos 12 meses nos murganhos PDAPP não tratados, o nível médio cerebelar de Aβ total foi de 15 ng/g (Tabela 4). Aos 15 meses, esta média aumentou para 28 ng/g e aos 18 meses aumentou para 35 ng/g. Os animais tratados com PBS apresentaram valores médios de Aβ total de 21 ng/g aos 15 meses e de 43 ng/g aos 18 meses. Verificou-se que os animais tratados com AN1792 possuem 22 ng/g de Aβ total aos 15 meses e significativamente menos (p=0,002) Aβ total aos 18 meses (25 ng/g) do que o correspondente grupo PBS (Tabela 4).

Tabela 4: Níveis médios de Aβ (ng/g) no cerebelo

NÃO TRATADO			PBS		AN1792	
Idade	**Aβ total**	**(n)**	**Aβ total**	**(n)**	**Aβ total**	(n)
12	15,6	(10)				
15	27,7	(10)	20,8	(9)	21,7	(10)
18	35,0	(10)	43,1	(12)	24,8*	(9)
						*p = 0,0018

4. Efeitos do Tratamento com AN1792 nos Níveis de APP

AAP-α e a molécula de APP de tamanho completo possuem ambas a totalidade ou parte da sequência Aβ e assim podem ser potencialmente afectadas pela geração de uma resposta imunitária dirigida contra AN1792. Nos estudos realizados até à data, foi observado um ligeiro aumento dos níveis de APP à medida que a neuropatologia aumenta no murganho PDAPP. No córtex, os níveis de AAP-α/FL (tamanho completo) ou de AAP-α permaneceram essencialmente inalterados pelo tratamento, com excepção de AAP-α ser reduzida em 19% aos 18 meses no grupo tratado com AN1792 *vs.* no grupo tratado com PBS. Os valores de APP tratado com AN1792 aos 18 meses não foram significativamente diferentes dos valores do grupo não tratado aos 12 meses e aos 15 meses e do grupo tratado com PBS aos 15 meses. Em todos os casos os valores de APP mantiveram-se dentro das gamas que são normalmente encontradas em murganhos PDAPP.

5. Efeitos do Tratamento com AN1792 na Patologia Neurodegenerativa e Gliótica

O desenvolvimento de placas neuríticas foi significativamente reduzido no córtex frontal de murganhos tratados com AN1792 comparativamente com o grupo de PBS aos 15 (84%; p=0,03) e 18 (55%; p=0,01) meses de idade (Fig. 8). O valor médio do desenvolvimento de placas neuríticas aumentou de 0,32% para 0,49% no grupo tratado com PBS entre os 15 e os 18 meses de idade. Isto contrastou com o desenvolvimento grandemente reduzido de placas neuríticas no grupo de AN1792, com valores médios de desenvolvimento de placas neuríticas de 0,05% e 0,22% nos grupos de 15 e 18 meses, respectivamente.

As imunizações com AN1792 pareceram serem bem toleradas e a astrocitose reactiva foi também significativamente reduzida no RSC dos murganhos tratados com AN1792, quando comparado com o grupo de PBS, aos 15 (56%; p=0,011) e aos 18 (39%; p=0,028) meses de idade (Fig. 9). Os valores médios da percentagem de astrocitose no grupo de PBS aumentaram entre os 15 e os 18 meses de 4,26% para 5,21%. O tratamento com AN1792 suprimiu o desenvolvimento de astrocitose em ambos os pontos de tempo para 1,89% e 3,2% respectivamente. Isto sugere que o neurópilo não foi lesado pelo processo de eliminação.

6. Respostas de Anticorpos

Como descrito atrás, os murganhos PDAPP heterozigóticos com onze meses de idade (n=24) receberam uma série de 5 imunizações de 100 µg de AN1792 emulsionado com adjuvante de Freund e administrado intraperitonealmente nas semanas 0, 2, 4, 8 e 12 e

uma sexta imunização com PBS sozinho (sem adjuvante de Freund) na semana 16. Como controlo negativo, uma série paralela de 24 murganhos transgénicos com a mesma idade recebeu imunizações de PBS emulsionado com os mesmos adjuvantes e administrado segundo o mesmo esquema. Os animais foram sangrados três a sete dias após cada imunização, começando após a segunda dose. As repostas de anticorpos contra AN1792 foram medidas por ELISA. As médias geométricas dos títulos (GMT) para os animais que foram imunizados com AN1792 foram de aproximadamente 1900, 7600 e 45000 após a segunda, a terceira e a última (sexta) doses, respectivamente. Não foram medidos anticorpos específicos de Aβ nos animais controlo após a sexta imunização.

Aproximadamente metade dos animais foi tratada durante mais três meses, recebendo imunizações aproximadamente às 20, 24 e 27 semanas. Cada uma das doses foi administrada no veículo PBS sozinho sem adjuvante de Freund. As médias dos títulos de anticorpos permaneceram inalteradas ao longo deste período de tempo. De facto, os títulos de anticorpos pareceram manter-se estáveis desde a quarta colheita de sangue até à oitava correspondendo a um período que vai da quinta à nona injecção.

Para determinar se os anticorpos específicos de Aβ, induzidos por imunização, que foram detectados nos soros de murganhos tratados nos com AN1792 também estavam associados a amilóide depositado no cérebro, uma subsérie de secções de murganhos tratados com AN1792 e com PBS, reagiram com um anticorpo específico para IgG de murganho. Ao contrário do grupo tratado com PBS, as placas Aβ nos cérebros tratados com AN1792 foram revestidas com IgG endógena. Esta diferença entre os dois grupos foi observada em grupos com 15 e 18 meses de idade. Foi particularmente notória a ausência de marcação no grupo PBS,

apesar da presença de um forte desenvolvimento amilóide nestes murganhos. Estes resultados mostram que a imunização com uma proteína Aβ sintética origina anticorpos que reconhecem e se ligam *in vivo* a Aβ nas placas amilóides.

7. Respostas Imunitárias Mediadas por Células

Os baços foram removidos de nove murganhos PDAPP, de 18 meses de idade, imunizados com AN1792 e 12 imunizados com PBS, 7 dias após a nona imunização. Os esplenócitos foram isolados e cultivados durante 72 horas na presença de Aβ40, Aβ42 ou Aβ40-1 (proteína com ordem reversa). O mitogénio Con A serviu como controlo positivo. Respostas óptimas foram obtidas com > 1,7 μM de proteína. As células dos nove animais tratados com AN1792 proliferaram como resposta à proteína Aβ1-40 ou Aβ1-42, com iguais níveis de incorporação para ambas as proteínas (Fig. 10, Painel superior). Não houve resposta à proteína reversa Aβ40-1. As células dos animais de controlo não responderam a qualquer uma das proteínas Aβ (Fig. 10, Painel inferior).

C. Conclusão

Os resultados deste estudo mostram que a imunização com AN1792 de murganhos PDAPP possuindo já depósitos amilóides reduz a velocidade de aparecimento e inibe a deposição progressiva de amilóide e retarda consequentes alterações neuropatológicas no cérebro de murganhos PDAPP idosos. As imunizações com AN1792 essencialmente pararam o desenvolvimento amilóide em estruturas que normalmente sucumbiriam à amiloidose. Assim, a administração

do péptido Aβ possui benefício terapêutico no tratamento de AD.

IV. Rastreio de Fragmentos Aβ

100 murganhos PDAPP de 9-11 meses de idade foram imunizados com 9 regiões diferentes de APP e Aβ para determinar quais os epitopos adequados à resposta. Os 9 imunogénios diferentes e um controlo foram injectados i.p. como descrito atrás. Os imunogénios incluem quatro péptidos Aβ humanos conjugados 1-12, 13-28, 32-28, 32-42, 1-5, todos acoplados a imunoglobulinas de carneiro anti-IgG de murganho através de uma ligação cistina; um polipéptido APP aa 592695, Aβ 1-40 humano agregado e Aβ 25-35 humano agregado e Aβ42 de roedor agregado. Aβ42 agregado e PBS foram utilizados como controlos. Foram utilizados dez murganhos por grupo de tratamento. Os títulos foram monitorizados como atrás e os murganhos foram eutanasiados ao fim de 4 meses de injecções. A histoquímica, os níveis de Aβ e a toxicologia foram determinados *post mortem*.

A. Materiais e Métodos

1. Preparação de Imunogénios

Preparação de péptidos Aβ acoplados: quatro conjugados de péptidos Aβ humanos (resíduos de aminoácidos 1-5, 1-12, 13-28 e 33-42, cada conjugado com IgG de carneiro anti-murganho) foram preparados através da junção com uma cisteína artificial adicionada ao péptido Aβ utilizando o reagente de ligação cruzada sulfo-EMCS. Os derivados do péptido Aβ foram sintetizados com as sequências de aminoácidos finais que se

seguem. Em cada caso, a localização do resíduo de císteina inserido está indicado a sublinhado. O derivado do péptido AB13-28 também tinha dois resíduos de glicina adicionados antes da cisteína no extremo carboxilo como indicado.

Péptido Aβ-12 NH_2-DAEFRHDSGYEVC COOH
Péptido Aβ1-5 NH_2-DAEFRC COOH
Péptido Aβ33-42 NH_2-C-ácido amino-heptanóico-GLMVGGVVIA COOH
Péptido AB13-28 Ac-NH-HHQKLVFFAEDVGSNKGGC-COOH

Para preparar a reacção de acoplamento, dez mg de IgG de carneiro anti-murganho (Jackson ImmunoResearch Laboratories) foram dialisados, de um dia para o outro, contra tampão borato de sódio 10 mM, pH 8,5. O anticorpo dialisado foi então concentrado para um volume de 2 mL utilizando um tubo Amicon Centriprep. Dez mg de sulfo-EMCS [N(ε-maleimidocuproiloxi)succinimida] (Molecular Sciences Co.) foram dissolvidas em um mL de água desionizada. Um excesso molar de 40 vezes de sulfo-EMCS foi adicionado gota a gota, com agitação, aos IgG de carneiro anti-murganho e depois a solução foi agitada durante mais dez minutos. Os IgG de carneiro anti-murganho activados foram purificados e trocado o tampão através da passagem por uma coluna de filtração em gel de 10 mL (Pierce Presto Column, adquirida à Pierce Chemicals) equilibrada com $NaPO_4$ 0,1 M, EDTA 5 mM, pH 6,5. As fracções contendo anticorpos, identificadas pela absorvância a 280 nm, foram reunidas e diluídas para uma concentração de aproximadamente 1 mg/mL, utilizando 1,4 mg por OD como coeficiente de extinção. Um excesso molar de 40 vezes do péptido Aβ foi dissolvido em 20 mL de $NaPO_4$ 10 mM, pH 8,0, com excepção do péptido Aβ33-42 para o qual 10 mg foram primeiro dissolvidas em 0,5 mL de DMSO e depois diluídas para 20 mL com tampão $NaPO_4$ 10 mM. As soluções de

péptidos foram cada adicionadas a 10 mL de IgG de carneiro anti-murganho activados e agitadas à temperatura ambiente durante 4 h. Os conjugados resultantes foram concentrados para um volume final inferior a 10 mL utilizando um tubo Amicon Centriprep e depois dialisados contra PBS para trocar de tampão e remover o péptido livre. Os conjugados foram passados através de filtros de 0,22 µ de poro para esterilização e depois divididos em fracções de 1 mg e guardados congelados a -20 °C. As concentrações dos conjugados foram determinadas utilizando o ensaio de proteínas BCA (Pierce Chemicals), com IgG de cavalo para a curva padrão. A conjugação foi documentada pelo aumento do peso molecular dos péptidos conjugados relativamente ao dos IgG de carneiro anti-murganho activados. O conjugado de Apβ1-5 e IgG de carneiro anti-murganho foi uma mistura de duas conjugações, o resto derivou de uma única preparação.

2. Preparação de Péptidos Aβ Agregados

Os péptidos humanos 1-40 (AN1528; California Peptides Inc., Lote ME0541), 1-42 (AN1792; Califórnia Peptides Inc., Lotes ME0339 e ME0439), 25-35 e de roedor 1-42 (Califórnia Peptides Inc., Lote ME0218) foram solubilizados de fresco para a preparação de cada das séries de injecções derivadas de pós liofilizados que tinham sido guardados na ausência de humidade a -20 °C. Para este fim, duas mg de péptido foram adicionadas a 0,9 mL de água desionizada e a mistura foi submetida a vórtex para dar origem a uma solução ou suspensão relativamente uniforme. Dos quatro, AN1528 foi o único péptido solúvel neste passo. Uma alíquota de 100 µL de PBS 10X (PBS IX: NaCl 0,15 M, fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,5) foi então adicionada, altura em que AN1528 começou a precipitar. A suspensão foi submetida a

vórtex novamente e incubada de um dia para o outro a 37 °C, para utilizar no dia seguinte.

Preparação da proteína pBx6: Um plasmídeo de expressão codificando pBx6, uma proteína de fusão consistindo na sequência líder N-terminal de 100 aminoácidos da polimerase do bacteriófago MS-2 seguida dos aminoácidos 592-695 de APP (βAPP) foi construída como descrto por Oltersdorf *et al.*, J. Biol. Chem. 265, 4492 4497 (1990). O plasmídeo foi utilizado para transfectar *E. coli* e a proteína foi expressa após indução do promotor. As bactérias foram lisadas em ureia 8 M e pBx6 foi parcialmente purificada através de SDS-PAGE preparativa. As fracções contendo pBx6 foram identificadas em transferência de Western utilizando anticorpo policlonal de coelho anti-pBx6, reunidas, concentradas utilizando um tubo Amicon Centriprep e dialisadas contra PBS. A pureza da preparação, estimada por coloração de SDS-PAGE com Azul Coomassie, foi de aproximadamente 5 a 10%.

B. Resultados e Discussão

1. Desenho do estudo

Cem murganhos transgénicos PDAPP heterozigóticos, com nove a onze meses de idade, machos e fêmeas, foram adquiridos a Charles River Laboratory e a Taconic Laboratory. Os murganhos foram separados em dez grupos para serem imunizados com diferentes regiões de Aβ ou APP combinado com adjuvante de Freund. Os animais foram distribuídos, tanto quanto possível, de acordo com o sexo, idade, progenitores e fonte dos animais dentro de cada grupo. Os imunogénios incluíram quatro péptidos

Aβ derivados da sequência humana, 1-5, 1-12, 13-28 e 33-42, cada um conjugado com IgG de carneiro anti-murganho, quatro péptidos Aβ agregados, 1-40 humano (AN1528), humano 1-42 (AN1792), humano 25-35 e roedor 1-42; e um polipéptido de fusão, designado como pBx6, contendo os resíduos de aminoácidos 592-695 de APP. Um décimo grupo foi imunizado com PBS combinado com adjuvante como controlo.

Para cada imunização, 100 µg de cada péptido Aβ em 200 µL de PBS ou 200 µg do pBx6 derivado de APP no mesmo volume de PBS ou PBS sozinho foi emulsionado a 1:1 (vol:vol) com adjuvante completo de Freund (CFA) num volume final de 400 µL para a primeira imunização, seguido de um reforço da mesma quantidade de imunogénio em adjuvante incompleto de Freund (IFA) para as quatro doses subsequentes e com PBS para a dose final. As imunizações foram administradas intraperitonealmente, num esquema bi-semanal para as três primeiras doses, depois seguiu-se um esquema mensal. Foi recolhido sangues dos animais quatro a sete dias após cada imunização, começando após a segunda dose, para medição dos títulos de anticorpos. Os animais foram eutanasiados aproximadamente uma semana após a dose final.

2. Níveis de Aβ e APP no Cérebro

Após aproximadamente quatro meses de imunização com os vários péptidos Aβ ou o derivado de APP, os cérebros foram removidos dos animais sob perfusão de solução salina. Um hemisfério foi preparado para análise imuno-histoquímica e o segundo foi utilizado para a quantificação dos níveis de Aβ e APP. Para medir as concentrações de várias formas do péptido amilóide beta e da proteína precursora beta, o hemisfério foi

dissecado e os homogenatos das regiões do hipocampo, cortical e cerebelar foram preparados em guanidina 5 M. Estes foram diluídos e o nível de amilóide ou de APP foi quantificado por comparação com uma série de diluições de padrões do péptido Aβ ou APP de concentrações conhecidas num formato de ELISA.

A concentração média de Aβ total para o grupo de controlo imunizado com PBS foi 5,8 vezes superior no hipocampo relativamente ao córtex (média de 24,318 ng/g de tecido de hipocampo comparado com 4221 ng/g para o córtex). O nível médio no cerebelo do grupo de controlo (23,4 ng/g de tecido) foi cerca de 1000 vezes inferior relativamente ao hipocampo. Estes níveis são semelhantes aos que foram descritos anteriormente para os murganhos transgénicos PDAPP heterozigóticos desta idade (Johnson-Woods *et al.*, 1997, supra).

Para o córtex, uma subsérie de grupos de tratamento teve níveis médios de Aβ e Aβ1-42 total que diferiram significativamente dos do grupo de controlo ($p<0,05$), esses animais receberam AN1792, Aβ1-42 de roedor ou o conjugado do péptido Aβ1-5 como mostrado na Fig. 11. Os níveis médios de Aβ total foram reduzidos em 75%, 79% e 61%, respectivamente, comparativamente com o controlo para estes grupos de tratamento. Não houve correlações discerníveis entre os títulos de anticorpos específicos de Aβ e os níveis de Aβ na região cortical do cérebro para qualquer um dos grupos.

No hipocampo, a redução média de Aβ total associada ao tratamento com AN1792 (46%, P=0,0543) não foi superior ao observado no córtex (75%, P=0,0021). No entanto, a ordem de grandeza da redução foi muito superior no hipocampo relativamente ao córtex, uma redução de 11186 ng/g de tecido no

hipocampo *versus* 3171 ng/g de tecido no córtex. Para os grupos de animais que receberam Aβ1-42 ou Aβ1-5 de roedor, os níveis médios totais de Aβ foram reduzidos em 36% e 26%, respectivamente. No entanto, dado o pequeno tamanho dos grupos e a elevada variabilidade dos níveis de péptido amilóide de animal para animal dentro de ambos os grupos, estas reduções não foram significativas. Quando os níveis de Aβ1-42 foram medidos no hipocampo, nenhuma das reduções induzidas pelo tratamento atingiu significância. Assim, devido ao menor aparecimento de Aβ no córtex, as alterações nesta região são um indicador mais sensível dos efeitos do tratamento. As alterações nos níveis de Aβ medidas por ELISA no córtex são semelhantes, mas não idênticas, aos resultados da análise imuno-histoquímica (ver abaixo).

Foi também medido o Aβ total no cerebelo, uma região tipicamente não afectada na patologia AD. Nenhuma das concentrações médias de Aβ de qualquer um dos grupos imunizados com os vários péptidos Aβ ou derivado de APP diferiu do grupo controlo nesta região do cérebro. Este resultado sugere que os níveis não patológicos de Aβ não sejam afectados pelo tratamento.

A concentração de APP foi também determinada por ELISA no córtex e cerebelo de murganhos tratados e de controlo. Foram utilizados dois ensaios de APP diferentes. O primeiro, designado AAP-α/FL, reconhece APP-alfa (α, a forma secretada de APP que foi clivada dentro da sequência Aβ) e formas de tamanho completo (FL) de APP, enquanto que o segundo reconhece apenas AAP-α. Ao contrário da diminuição de Aβ associada ao tratamento numa subsérie de grupos de tratamento, os níveis de APP ficaram inalterados em todos os animais tratados comparativamente com os

animais de controlo. Estes resultados indicam que as imunizações com os péptidos Aβ não eliminam APP, mas antes o efeito do tratamento é específico de Aβ.

Resumidamente, os níveis totais de Aβ e Aβ1-42 foram significativamente reduzidos no córtex através do tratamento com AN1792, Aβ1-42 de roedor ou conjugado de Aβ1-5. No hipocampo, Aβ total foi significativamente reduzido apenas por tratamento com AN1792. Não foram significativas as alterações associadas ao tratamento nos níveis de Aβ ou APP nas regiões do hipocampo, cortical ou cerebelar.

2. Análises Histoquímicas

Os cérebros de uma subsérie de seis grupos foram preparados para análise imuno-histoquímica, três grupos imunizados com os conjugados do péptido Aβ, Aβ1-5, Aβ1-12 e Aβ13-28; dois grupos imunizados com os agregados Aβ de tamanho completo AN1792 e AN1528 e o grupo de controlo tratado com PBS. Os resultados das análises de imagens do desenvolvimento amilóide nas secções de cérebro destes grupos são mostrados na Fig. 12. Houve reduções significativas do desenvolvimento amilóide nas regiões corticais dos grupos de tratamento *versus* animais de controlo. A maior redução do desenvolvimento amilóide foi observada no grupo que recebeu AN1792, em que o valor médio foi reduzido em 97% (p=0,001). Foram também observadas reduções significativas para os animais tratados com AN1528 (95%, p=0,005) e com o conjugado do péptido Aβ1-5 (67%, p=0,02).

Os resultados obtidos pela quantificação de Aβ ou de Aβ1-42 total por ELISA e o desenvolvimento amilóide por análise de

imagens diferem até certo ponto. O tratamento com AN1528 teve um impacto significativo no nível de desenvolvimento amilóide cortical quando medido através da análise quantitativa de imagens mas não na concentração de Aβ total na mesma região quando medido por ELISA. A diferença entre estes dois resultados é provavelmente devido às especificidades dos ensaios. A análise de imagens mede apenas o Aβ insolúvel agregado em placas, o ELISA mede todas as formas de Aβ, tanto solúveis como insolúveis, monoméricas e agregadas. Uma vez que se pensa que a patologia da doença esteja associada à forma insolúvel associada a placas de Aβ, a técnica de análise de imagens pode ter mais sensibilidade para revelar os efeitos do tratamento. No entanto, uma vez que o ELISA é um ensaio mais rápido e mais fácil, é muito útil para fins de rastreio. Além disso, pode revelar que a redução de Aβ associada ao tratamento é superior para Aβ associada a placas do que para Aβ total.

Para determinar se os anticorpos específicos de Aβ induzidos por imunização nos animais tratados reagiam com amilóide depositada no cérebro, uma subsérie das secções dos animais tratados e dos murganhos de controlo foi incubada com um anticorpo específico de IgG de murganho. Ao contrário do grupo de PBS, as placas contendo Aβ foram revestidas com IgG endógeno para os animais imunizados com os conjugados do péptido Aβ, Aβ1-5, Aβ1-12 e Aβ13-28; e os agregados de Aβ de tamanho completo AN1792 e AN1528. Os cérebros dos animais imunizados com os outros péptidos Aβ ou com o péptido APP pBx6 não foram analisados neste ensaio.

3. Medição dos Títulos de Anticorpos

Foi recolhido sangue aos murganhos quatro a sete dias após cada imunização, começando após a segunda imunização, num total de cinco recolhas. Os títulos de anticorpos foram medidos como anticorpo de ligação a Aβ1-42 utilizando um ELISA tipo sanduíche em placas de plástico multi-poços revestidas com Aβ1-42. Como mostrado na Fig. 13, os títulos dos picos de anticorpos foram induzidos após a quarta dose para as quatro vacinas, as quais induziram os títulos mais elevados de anticorpos específicos de AN1792: AN1792 (pico GMT: 94647), AN1528 (pico GMT: 88231), conjugado de Aβ1-12 (pico GMT: 47216) e Aβ1-42 de roedor (pico gMT: 10766). Os títulos para estes grupos baixaram após a quinta e a sexta doses. Para os restantes cinco imunogénios, os títulos do pico foram atingidos após a quinta e a sexta doses e estes foram de uma ordem de grandeza mais baixa do que a dos quatro grupos com títulos mais elevados: conjugado de Aβ1-5 (pico GMT; 2356), pBx6 (pico GMT:1986), conjugado Aβ13-28 (pico GMT: 1183), conjugado Aβ33-42 (pico GMT: 658), Aβ25-35 (pico GMT: 125). Os títulos de anticorpos foram igualmente medidos contra os péptidos homólogos utilizando o mesmo formato de ELISA tipo sanduíche para uma subsérie dos imunogénios, os grupos imunizados com Aβ1-5, Aβ13-28, Aβ25-35, Aβ33-42 ou Aβ1-42 de roedor. Estes títulos foram aproximadamente os mesmos medidos contra Aβ1-42 excepto para o imunogénio Aβ1-42 de roedor em que os títulos de anticorpos contra o imunogénio homólogo foram cerca de duas vezes mais altos. A grandeza do título de anticorpos específicos para AN1792 de animais individuais ou os valores médios dos grupos de tratamento não estão correlacionados com a eficácia medida pela redução de Aβ no córtex.

4. Respostas Linfoproliferativas

A linfoproliferação dependente de Aβ foi medida utilizando as células de baço colhidas aproximadamente uma semana após a sexta e última imunização. As células colhidas de fresco, 10^5 por poço, foram cultivadas durante 5 dias na presença de Aβ1-40 numa concentração de 5 μM para estimulação. As células de uma subsérie de sete dos dez grupos foram também cultivadas na presença do péptido reverso, Aβ40-1. Como controlo positivo, células adicionais foram cultivadas com o mitogénio de células T, PHA, e como controlo negativo, as células foram cultivadas sem péptido adicionado.

Os linfócitos da maioria dos animais proliferaram como resposta a PHA. Não houve respostas significativas ao péptido reverso Aβ40-1. As células dos animais imunizados com os maiores péptidos Aβ agregados, AN1792, Aβ1-42 de roedor e AN1528 proliferaram de forma robusta quando estimuladas com Aβ1-40 com os cpm mais elevados nos recipientes de AN1792. Um animal em cada um dos grupos imunizados com o conjugado de Aβ1-12, conjugado de AB13-28 e Aβ25-35 proliferaram como resposta a Aβ1-40. Os restantes grupos receberam conjugado de Aβ1-5, pBx6 conjugado com Aβ33-42 ou PBS não tinham animais com uma resposta estimulada por Aβ. Estes resultados estão resumidos na Tabela 5 abaixo.

Tabela 5

Imunogénio	Conjugado	Aminoácidos Aβ	Reactivos
Aβ1-5	sim	5-mero	0/7
Aβ1-12	sim	12-mero	1/8
AB13-28	sim	16-mero	1/9
Aβ25-35		11-mero	1/9
Aβ33-42	sim	10-mero	1/9
Aβ1-40		40-mero	5/8
Aβ1-42		42-mero	9/9
rAβ1-42		42-mero	8/8
pBx6			0/8
PBS		0-mero	0/8

Estes resultados mostram que AN1792 e AN1528 estimulam fortes respostas de células T, muito provavelmente do fenótipo $CD4^+$. A ausência de uma resposta de células T específica de Aβ em animais imunizados com Aβ1-5 não é surpreendente uma vez que os epitopos peptídicos reconhecidos pelas células T $CD4^+$ têm geralmente 15 aminoácidos de comprimento, se bem que péptidos mais pequenos possam por vezes funcionar com menos eficiência. Assim a maioria dos epítopos das células T auxiliares para os quatro péptidos conjugados residem provavelmente no parceiro do conjugado de IgG, não na região Aβ. Esta hipótese é apoiada pela baixa incidência de respostas proliferativas dos animais de cada um destes grupos de tratamento. Uma vez que o conjugado Aβ1-5 foi eficaz na redução significativa do nível de Aβ no cérebro, na aparente ausência de células T específicas de Aβ, a resposta imunitária efectora chave induzida pela imunização com este

péptido parece ser do tipo anticorpo.

A ausência de células T e a baixa resposta de anticorpos relativamente ao péptido de fusão pBx6, incluindo os aminoácidos 592-695 de APP, incluindo todos os resíduos Aβ, pode ser devido à fraca imunogenicidade desta preparação particular. A fraca imunogenicidade do Aβ25-35 agregado é provavelmente devido ao péptido ser muito pequeno para poder conter um bom epítopo de células T para auxiliar a indução de uma resposta de anticorpos. Se este péptido for conjugado com uma proteína transportadora, será provavelmente mais imunogénico.

V. Preparaçao de Anticorpos Policlonais para Protecção Passiva

Foram imunizados 20 murganhos não-transgénicos com Aβ ou outro imunogénio, opcionalmente com adjuvante e foram eutanasiados após 4-5 meses. Foi recolhido sangue dos murganhos imunizados. Opcionalmente, a IgG é separada dos outros componentes sanguíneos. Os anticorpos específicos para o imunogénio podem ser parcialmente purificados por cromatografia de afinidade. É obtida uma média de cerca de 0,5-1 mg de anticorpo específico do imunogénio por murganho, proporcionando um total de 5-10 mg.

VI. Imunização Passiva com Anticorpos contra Aβ

Grupos de murganhos PDAPP, com 7-9 meses de idade, foram injectados com 0,5 mg de anti-Aβ policlonal em PBS ou anti-Aβ monoclonais específicos, como mostrado abaixo. Todas as

preparações de anticorpo são purificadas para terem níveis de endotoxina baixos. Os monoclonais podem ser preparados contra um fragmento por injecção do fragmento ou forma mais longa de Aβ num murganho, preparando hibridomas e rastreando os hibridomas para um anticorpo que se liga especificamente a um fragmento desejado de Aβ sem se ligar a outros fragmentos não sobrepostsos de Aβ.

Tabela 6

Anticorpo	Epitopo
2H3	Aβ 1-12
10D5	Aβ 1-12
266	Aβ 13-28
21F12	Aβ 33-42
Policlonal Aβ42 de murganho anti-humano	Anti-Aβ42 Agregado

Os murganhos foram injectados i.p., consoante necessário, ao longo de um período de 4 meses para manter uma concentração de anticorpo em circulação, medido por título de ELISA, superior a 1/1000, definido por ELISA para Aβ42 ou outro imunogénio. Os títulos são monitorizados como acima e os murganhos são eutanasiados ao fim de 4 meses de injecções. A histoquímica, níveis de Aβ e toxicologia são efectuadas *post mortem*. São utilizados dez murganhos por grupo.

VII. Comparação de Diferentes Adjuvantes

Este exemplo compara CFA, alum, uma emulsão de óleo em água e MPL relativamente à capacidade de estimular uma resposta imunitária.

A. Materiais e Métodos

1. Desenho do Estudo

Uma centena de cobaias fêmeas, estirpe Hartley, com seis semanas de idade, adquiridas a Elm Hill, foi distribuída por dez grupos a serem imunizados com AN1792 ou um seu derivado palmitoilado combinado com vários adjuvantes. Sete grupos receberam injecções de AN1792 (33 µg, a menos que seja especificado de outra forma) combinado com a) PBS, b) adjuvante de Freund, c) MPL, d) esqualeno, e) MPL/esqualeno, f) dose baixa de alum ou g) dose elevada de alum (300 µg de AN1792). Dois grupos receberam injecções de um derivado palmitoilado de AN1792 (33 µg) combinado com a) PBS ou b) esqualeno. Um grupo final de dez recebeu PBS sem antigénio ou adjuvante adicional. Para o grupo que recebeu adjuvante de Freund, a primeira dose foi emulsionada com CFA e as restantes quatro doses com IFA. O antigénio foi administrado numa dose de 33 µg para todos os grupos excepto o grupo da dose elevada com alum, que recebeu 300 µg de AN1792. As injecções foram administradas intraperitonealmente para CFA/IFA e intramuscularmente nos quadrícepes dos membros traseiros, alternadamente no lado direito e esquerdo, para todos os outros grupos. As três primeiras doses foram administradas num esquema bi-semanal seguido de duas doses com um intervalo mensal. Colheu-se sangue

seis a sete dias após cada imunização, começando após a segunda dose, para medição dos títulos de anticorpos.

2. Preparação de Imunogénios

Foram adicionadas duas mg de Aβ42 (Califórnia Peptide, Lote ME0339) a 0,9 mL de água desionizada e a mistura foi submetida a vórtex para proporcionar uma suspensão relativamente uniforme. Adicionou-se uma alíquota de PBS 10X (1XPBS, NaCl 0,15 M, fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,5). A suspensão foi de novo submetida a vórtex e incubada, de um dia para o outro, a 37 °C para ser utilizada no dia seguinte. O Aβ1-42 não utilizado foi guardado com excicante, como pó liofilizado, a -20 °C.

O derivado palmitoilado de AN1792 foi preparado através do acoplamento de anidrido palmítico, dissolvido em dimetilformamida, ao resíduo do terminal amina de AN1792, antes da remoção do péptido nascente da resina, através do tratamento com ácido hidrofluórico.

Para preparar as doses de vacina com adjuvante completo de Freund (CFA) (grupo 2), 33 µg de AN1792 em 200 µL de PBS foi emulsionado a 1:1 (vol:vol) com CFA num volume final de 400 µL para a primeira imunização. Para as imunizações subsequentes, o antigénio foi emulsionado de forma semelhante com adjuvante incompleto de Freund (IFA).

Para preparar as doses de vacinas com MPL para os grupos 5 e 8, foi adicionado pó liofilizado (Ribi Immunochem Research, Inc., Hamilton, MT) a 0,2% de trietilamina aquosa para uma concentração final de 1 mg/mL e submetido a vórtex. A mistura

foi aquecida entre 65 e 70 °C durante 30 segundos para proporcionar uma suspensão uniforme de micelas ligeiramente opaca. A solução foi preparada de fresco para cada série de injecções. Para cada injecção no grupo 5, 33 µg de AN1792 em 16,5 µL de PBS, 50 µg de MPL (50 µL) e 162 µL de PBS foram misturados num tubo de boro-silicato imediatamente antes de serem utilizados.

Para preparar as doses de vacinas com a emulsão fraca de óleo em água, AN1792 foi adicionado a 5% de esqualeno, 0,5% de Tween 80, 0,5% de Span 85 em PBS para atingir uma concentração final de dose única de 33 µg de AN1792 em 250 µL (grupo 6). A mistura foi emulsionada por passagem através de um sistema manual de duas câmaras, 15 a 20 vezes, até surgirem gotículas de emulsão que parecem ter um diâmetro aproximadamente igual ao de esferas de látex padrão com 1,0 µm de diâmetro quando observado ao microscópio. A suspensão resultante era branca leitosa opalescente. As emulsões foram preparadas de fresco para cada série de injecções. Para o grupo 8, MPL em trietilamina a 0,2% foi adicionado numa concentração de 50 µg por dose à mistura de esqualeno e detergente para emulsão como referido atrás. Para o derivado palmitoilo (grupo 7), foram adicionadas 33 µg por dose de palmitoil-NH-Aβ1-42 a esqualeno e submetidas a agitação com vórtex. Foram depois adicionados Tween 80 e Span 85 com vórtex. Esta mistura foi adicionada a PBS para atingir concentrações finais de esqualeno a 5%, Tween 80 a 0,5%, Span 85 a 0,5% e a mistura foi emulsionada como referido atrás.

Para preparar as doses de vacina com alum (os grupos 9 e 10), AN1792 em PBS foi adicionado a Alhydrogel (gel de hidróxido de alumínio, Accurate, Westbury, NI) para atingir concentrações de 33 µg (dose baixa, grupo 9) ou 300 µg (dose elevada, grupo

10) de AN1792 por 5 mg de alum num volume final de dose de 250 µL. A suspensão foi suavemente misturada durante 4 h à temperatura ambiente.

3. Medição dos Títulos de Anticorpos

Colheu-se sangue dos cobaios seis a sete dias após imunização, começando após a segunda imunização, num total de quatro recolhas. Os títulos de anticorpos contra Aβ42 foram medidos por ELISA como descrito em Materiais e Métodos Gerais.

4. Preparação de Tecidos

Após cerca de 14 semanas, todos os cobaios receberam CO_2. O fluido cerebroespinal foi recolhido e os cérebros foram removidos e três regiões do cérebro (hipocampo, córtex e cerebelo) foram dissecadas e utilizadas para medir a concentração de proteína Aβ total utilizando ELISA.

B. Resultados

1. Respostas de Anticorpos

Houve uma larga gama na potência dos vários adjuvantes quando medida como resposta de anticorpos contra AN1792 após a imunização. Como mostrado na Fig. 14, quando AN1792 foi administrado em PBS, não foram detectados anticorpos após duas ou três imunizações e respostas negligíveis foram detectadas após a quarta e a quinta doses com títulos de médias geométricas

(GMT) de apenas cerca de 45. A emulsão de óleo em água induziu títulos modestos após a terceira dose (GMT 255), que foram mantidos após a quarta dose (GMT 301) e caíram após a quarta dose (GMT 54). Houve uma clara resposta dependente da dose de antigénio para AN1792 ligado a alum, com 300 µg sendo mais imunogénico em todos os pontos de tempo do que 33 µg. Nos picos da resposta de anticorpos, após a quarta imunização, a diferença entre as duas doses foi de 43% com GMT de aproximadamente 1940 (33 µg) e 3400 (300 µg). A resposta de anticorpos a 33 µg de AN1792 mais MPL foi muito semelhante à proporciona com uma dose quase dez vezes superior de antigénio (300 µg) ligado a alum. A adição de MPL a uma emulsão de óleo em água baixou em 75% a potência da vacina relativamente à que inclui MPL como único adjuvante. Um derivado palmitoilado de AN1792 foi completamente não imunogénico quando administrado em PBS e proporcionou títulos modestos quando apresentado numa emulsão de óleo em água, com GMT de 340 e 105 para a terceira e quarta colheitas de sangue. Os títulos de anticorpos mais elevados foram proporcionados com adjuvante de Freund com um pico GMT de aproximadamente 87000, um valor quase 30 vezes superior ao dos GMT das duas vacinas a seguir mais potentes, MPL e a dose mais elevada de AN1792/alum.

Os adjuvantes mais promissores identificados neste estudo são MPL e alum. Destes dois, MPL parece preferível devido a ser necessária uma dose de antigénio 10 vezes mais baixa para proporcionar a mesma resposta de anticorpos obtida com alum. A resposta pode ser aumentada através do aumento da dose de antigénio e/ou adjuvante e através da optimização do esquema de imunização. A emulsão de óleo em água foi um adjuvante muito fraco para AN1792 e a adição de uma emulsão de óleo em água ao adjuvante MPL diminuiu a actividade intrínseca do adjuvante MPL

por si só.

2. Níveis de Aβ no Cérebro

Por volta das 14 semanas os cobaios foram anestesiados profundamente, foi removido o líquido cerebroespinal (CSF) e os cérebros foram removidos dos animais numa subsérie de grupos, os imunizados com o adjuvante de Freund (grupo 2), MPL (grupo 5), alum com uma dose elevada, 300 pg, de AN1792 (grupo 10) e o grupo de controlo imunizado com PBS (grupo 3). Para medir o nível de péptido Aβ, foi dissecado um hemisfério e os homogenatos das regiões do hipocampo, cortical e cerebelar foram preparados em guanidina 5 M. Estas foram diluídas e quantificadas por comparação com uma série de diluições de padrões da proteína Aβ de concentrações conhecidas num formato de ELISA. Os níveis da proteína Aβ no hipocampo, no córtex e no cerebelo foram muito semelhantes para os quatro grupos, apesar da larga gama de respostas de anticorpos contra Aβ induzida por estas vacinas. Níveis médios de Aβ de aproximadamente 25 ng/g de tecido foram medidos no hipocampo, 21 ng/g no córtex e 12 ng/g no cerebelo. Assim, a presença de um título elevado de anticorpos circulantes contra Aβ durante quase três meses nalguns destes animais não alterou os níveis de Aβ nos seus cérebros. Os níveis de Aβ no CSF foram também muito semelhantes entre os grupos. A ausência de um grande efeito da imunização de AN1792 sobre o Aβ endógeno indica que a resposta imunitária é focada nas formações patológicas de Aβ.

VIII. Resposta Imunitária a Diferentes Adjuvantes em Murganhos

Foram utilizados murganhos Swiss Webster fêmeas de seis semanas de idade, para este estudo, com 10-13 animais por grupo. Foram feitas imunizações nos dias 1, 14, 28, 60, 90 e 20, administradas subcutaneamente num volume de dose de 200 µL. O PBS foi utilizado como tampão para todas as formulações. Recolheu-se ssangue dos animais sete dias após cada imunização começando após a segunda dose para análise dos títulos de anticorpos por ELISA. O regime de tratamento de cada grupo está resumido na Tabela 7.

Tabela 7

Desenho experimental do estudo Betabloc 010					
Grupo	N[a]	Adjuvante[b]	Dose	Antigénio	Dose (µg)
1	10	MPL	12,5 µg	AN1792	33
2	10	MPL	25 µg	AN1792	33
3	10	MPL	50 µg	AN1792	33
4	13	MPL	125 µg	AN1792	33
5	13	MPL	50 µg	AN1792	150
6	13	MPL	50 µg	AN1528	33
7	10	PBS		AN1792	33
8	10	PBS		nenhum	
9	10	Esqualeno emulsionado	5%	AN1792	33
10	10	Esqualeno misturado	5%	AN1792	33
11	10	Alum	2 mg	AN1792	33
12	13	MPL + Alum	50 µg/2 mg	AN1792	33
13	10	QS21	5 µg	AN1792	33

(continuação)

Desenho experimental do estudo Betabloc 010					
Grupo	N[a]	Adjuvante[b]	Dose	Antigénio	Dose (µg)
14	10	QS21	10 µg	AN1792	33
15	10	QS21	25 µg	AN1792	33
16	13	QS21	25 µg	AN1792	150
17	13	QS21	25 µg	AN1528	33
18	13	QS21 + MPL	25 µg/ 150 µg	AN1792	33
19	13	QS21 + Alum	25 µg/2 mg	AN1792	33

Notas de rodapé:

[a] Número de murganhos em cada grupo no início da experiência.

[b] Estão referidos os adjuvantes. O tampão para todas estas formulações foi PBS. Para o grupo 8, não houve adjuvante ou antigénio.

Os títulos de ELISA dos anticorpos contra Aβ42 em cada grupo estão apresentados na Tabela 8 abaixo.

Tabela 8

Média geométrica dos títulos de anticorpos					
Semana da recolha de sangue					
Grupo de tratamento	2,9	5,0	8,7	12,9	16,7
1	248	1797	2577	6180	4177
2	598	3114	3984	5287	6878
3	1372	5000	7159	12333	12781
4	1278	20791	14368	20097	25631
5	3288	26242	13229	9315	23742
6	61	2536	2301	1442	4504

(continuação)

Média geométrica dos títulos de anticorpos					
Semana da colheita de sangue					
Grupo de tratamento	2,9	5,0	8,7	12,9	16,7
7	37	395	484	972	2149
8	25	25	25	25	25
9	25	183	744	952	1823
10	25	89	311	513	817
11	29	708	2618	2165	3666
12	198	1458	1079	612	797
13	38	433	566	1080	626
14	104	541	3247	1609	838
15	212	2630	2472	1224	1496
16	183	2616	6680	2085	1631
17	28	201	375	222	1540
18	31699	15544	23095	6412	9059
19	63	243	554	299	441

A tabela mostra que os títulos mais elevados foram obtidos para os grupos 4, 5 e 18, em que os adjuvantes foram 125 µg de MPL, 50 µg e QS21 mais MPL.

IX. Eficácia Terapêutica de Diferentes Adjuvantes

Foi efectuado um estudo de eficácia terapêutica em murganhos transgénicos PDAPP com uma série de adjuvantes adequados para utilizar em humanos para determinar a sua capacidade para potenciar as respostas imunes contra Aβ e para induzir a eliminação de depósitos amilóides no cérebro mediada pela resposta imunitária.

Cento e oitenta murganhos transgénicos PDAPP heterozigóticos, machos e fêmeas, com 7,5-8,5 meses de idade foram adquiridos à Charles River. Os murganhos foram distribuídos por nove grupos contendo 15 a 23 animais por grupo para serem imunizados com AN1792 ou com AN1528 combinado com vários adjuvantes. Os animais foram distribuídos para combinar o género, a idade e os progenitores dos animais dentro dos grupos tanto quanto possível. Os adjuvantes incluíram alum, MPL e QS21, cada um deles combinado com ambos os antigénios e adjuvante de Freund (FA) combinado com apenas AN1792. Um grupo adicional foi imunizado com AN1792 formado em tampão PBS mais o conservante timerosal sem adjuvante. Um nono grupo foi imunizado com PBS apenas como controlo negativo.

Preparação de péptidos Aβ agregados: os péptidos Aβ1-40 humano (AN1528; California Peptids Inc., Napa, CA; Lote ME0541) e Aβ1-42 humano (AN1792; Califórnia Peptides Inc., Lote ME0439) foram solubilizados de fresco para a preparação de cada uma das séries de injecções derivadas de pós liofilizados que tinham sido guardados secos a -20 °C. Para este fim, foram adicionadas duas mg de péptidos a 0,9 mL de água desionizada e a mistura foi agitada com vórtex para gerar uma solução ou suspensão relativamente uniforme. AN1528 mostrou-se solúvel neste passo, ao contrário de AN1792. Uma alíquota de 100 µL de PBS 10X (PBS IX: NaCl 0,15 M, fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,5) foi então adicionada, altura em que AN1528 começou a precipitar. As suspensões foram submetidas a vórtex novamente e incubadas de um dia para o outro a 37 °C para utilizar no dia seguinte.

Para preparar doses de vacina com alum (Grupos 1 e 5), o péptido Aβ em PBS foi adicionado a Alhydrogel (gel aquoso de hidróxido de alumínio a dois por cento, Sargeant, Inc., Clifton,

NJ) para atingir concentrações de 100 µg de péptido Aβ por 1 mg de alum, adicionou-se PBS 10X para um volume de dose final de 200 µL em PBS 1x. A suspensão foi então suavemente misturada durante aproximadamente 4 h, à temperatura ambiente, antes da injecção.

Para preparar as doses de vacina com MPL (grupos 2 e 6), foi adicionado pó liofilizado (Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT; Lote 67039-E0896B) a 0,2% de trietilamina aquosa para uma concentração final de 1 mg/mL e agitado com vórtex. A mistura foi aquecida a 65 a 70 °C durante 30 s para criar uma suspensão uniforme de micelas ligeiramente opaca. A solução foi guardada a 4 °C. Para cada série de injecções, foram misturados 100 µg de péptido por dose em 50 µL de PBS, 50 µg de MPL por dose (50 µL) e 100 µL de PBS por dose num tubo de boro-silicato imediatamente antes de utilizar.

Para preparar doses de vacina com QS21 (Grupos 3 e 7), foi adicionado pó liofilizado (Aquila, Framingham, MA; Lote A7018R) a PBS, pH 6, 6-6,7 para uma concentração final de 1 mg/mL e agitado com vórtex. A solução foi guardada a -20 °C. Para cada série de injecções, 100 µg de péptido por dose em 50 µL de PBS, 25 µg de QS21 por dose em 25 µL de PBS e 125 µL de PBS por dose foram misturados num tubo de boro-silicato imediatamente antes de utilizar.

Para preparar doses de vacina com adjuvante de Freund (Grupo 4), foram emulsionadas 100 µg de AN1792 em 200 µL de PBS a 1:1 (vol:vol) com adjuvante completo de Freund (CFA) num volume final de 400 µL, para a primeira imunização. Para subsequentes imunizações, o antigénio foi emulsionado de forma semelhante com adjuvante incompleto de Freund (IFA). Para as

vacinas contendo os adjuvantes alum, MPL ou QS21, 100 µg por dose de AN1792 ou de AN1528 foi combinado com alum (1 mg por dose) ou MPL (50 µg por dose) ou QS21 (25 µg por dose) num volume final de 200 µL em PBS e administrado por inoculação subcutânea no dorso entre as espáduas. Para o grupo que recebeu FA, 100 µg de AN1792 foi emulsionado a 1:1 (vol:vol) com adjuvante completo de Freund (CFA) num volume final de 400 µL e administrado intraperitonealmente para a primeira imunização, seguido de um reforço da mesma quantidade de imunogénio em adjuvante incompleto de Freund (IFA) para as cinco doses subsequentes. Para o grupo que recebeu AN1792 sem adjuvante, foram combinadas 10 µg de AN1792 com 5 µg de timerosal num volume final de 50 µL de PBS e administrado subcutaneamente. O nono grupo de controlo recebeu apenas 200 µL de PBS administrado subcutaneamente. As imunizações foram administradas num esquema bi-semanal para as primeiras três doses, em seguida num esquema mensal nos dias O, 16, 28, 56, 85 e 112. Recolheu-se sangue dos animais seis a sete dias após cada uma das imunizações, começando após a segunda dose, para a medição dos títulos de anticorpos. Os animais foram eutanasiados aproximadamente uma semana após a dose final. Os resultados foram medidos através do ensaio de ELISA para os níveis de Aβ e APP no cérebro e por avaliação imuno-histoquímica da presença de placas amilóides nas secções de cérebro. Além disso, foram determinados os títulos de anticorpos específicos de Aβ e as respostas proliferativas e de citocinas dependentes de Aβ.

A Tabela 9 mostra que os títulos mais elevados de anticorpos contra Aβ1-42 foram induzidos com FA e AN1792, os títulos que atingiram o máximo após a quarta imunização (pico GMT: 75386) e depois baixou em 59% após a sexta imunização final. O título médio de pico induzido por MPL com AN1792 foi

62% mais baixo do que o gerado com FA (pico GMT: 28867) e foi também atingido mais cedo no esquema de imunização, após 3 doses, seguido de um declínio até 28% do valor do pico após a sexta imunização. O título médio do pico gerado com QS21 combinado com AN1792 (GMT: 1511) foi cerca de 5 vezes mais baixo do que o obtido com MPL. Além disso, as cinéticas da resposta foram mais lentas, uma vez que foi necessária mais uma imunização para atingir a resposta do pico. Os títulos gerados por AN1792 ligado a alum foram marginalmente superiores aos obtidos com QS21 e as cinéticas de resposta foram mais rápidas. Para AN1792 administrado em PBS com timerosal a frequência e tamanho dos títulos foram ligeiramente superiores às de PBS sozinho. Os títulos dos picos gerados com MPL e AN1528 (pico/GMT 3099) foram cerca de 9 vezes mais baixos do que os proporcionados com AN1792. O NA-1528 ligado a alum foi muito pouco imunogénico, com títulos baixos proporcionados em apenas alguns dos animais. Não foram observadas respostas de anticorpos nos animais de controlo imunizados apenas com PBS.

Tabela 9

Média geométrica dos títulos de anticorpos[a]					
Semana da colheita de sangue					
Tratamento	3,3	5,0	9,0	13,0	17,0
Alum/AN1792	102 (12/21)[b]	1081 (17/20)	2366 (21/21)	1083 (21/21)	572 (18/21)
MPL/AN1792	6241 (21/21)	28867 (21/21)	11242 (21/21)	5665 (20/20)	8204 (20/20)
QS21/AN1792	30 (1/20)	227 (10/19)	327 (10/19)	1511 (17/18)	1188 (14/18)
CFA/AN1792	10076 (15/15)	61279 (15/15)	75386 (15/15)	41628 (15/15)	30574 (15/15)

(continuação)

Média geométrica dos títulos de anticorpos[a]					
Semana da colheita de sangue					
Tratamento	3,3	5,0	9,0	13,0	17,0
Alum/AN1528	25 (0/21)	33 (1/21)	39 (3/20)	37 (1/20)	31 (2/20)
MPL/AN1528	184 (15/21)	2591 (20/21)	1653 (21/21)	1156 (10/20)	3099 (20/20)
QS21/AN1528	29 (1/22)	221 (13/22)	51 (4/22)	820 (20/22)	2994 (21/22)
PBS mais Timerosal	25 (0/16)	33 (2/16)	39 (4/16)	37 (3/16)	47 (4/16)
PBS	25 (0/16)	25 (0/16)	25 (0/15)	25 (0/12)	25 (0/16)
Notas de rodapé: [a] Média geométrica dos títulos de anticorpos contra Aβ1-42 [b] Número de elementos que responderam por grupo					

Os resultados do tratamento com AN1792 ou AN1592, com vários adjuvantes ou timerosal, no desenvolvimento amilóide cortical em murganhos com 12 meses de idade, determinados por ELISA, são mostrados na Fig. 15. Nos murganhos PDAPP de controlo que receberam PBS, o nível médio de Aβ total no córtex aos 12 meses foi de 1,817 ng/g. Foram observados níveis fortemente reduzidos de Aβ em murganhos tratados com AN1792 mais CFA/IFA, AN1792 mais alum, AN1792 mais MPL e QS21 mais AN1792. A redução atingiu significância estatística ($p < 0,05$) apenas para AN1792 mais CFA/IFA. No entanto, como se mostra nos Exemplos I e III, os efeitos de imunização na redução dos níveis de Aβ tornou-se substancialmente maior em murganhos com 15 meses e 18 meses de idade. Assim, espera-se que pelo menos as composições AN1792 mais alum, AN1792 mais MPL e AN1792 mais QS21 atinjam significância estatística no tratamento de murganhos mais velhos. Ao contrário, o AN1792 mais o conservante timerosal

apresentou aproximadamente o mesmo nível médio de Aβ dos murganhos tratados com PBS. Resultados semelhantes foram obtidos quando os níveis corticais de Aβ42 foram comparados. O nível médio de Aβ42 nos controlos de PBS foi de 1624 ng/g. Foram observados níveis médios fortemente reduzidos de 403, 1149, 620 e 714 nos murganhos tratados com AN1792 mais CFA/IFA, AN1792 mais alum, AN1792 mais MPL e AN1792 mais QS21 respectivamente, com a redução a atingir significância estatística (p=0,05) para o grupo de tratamento AN1792CFA/IFA. O nível médio nos murganhos tratados com AN1792 timerosal foi de 1619 ng/g Aβ42.

X. Análise de Toxicidade

Foram recolhidos tecidos para análise histopatológica no final dos estudos descritos nos Exemplos 2, 3 e 7. Ainda, a hematologia e a química clínica foi realizada nas amostras de sangue terminais dos Exemplos 3 e 7. A maior parte dos órgãos principais foram avaliados, incluindo cérebro, pulmão, tecido linfóide, tecido gastrointestinal, fígado, rim, glândulas supra-renais e gónadas. Se bem que fossem observadas lesões esporádicas nos animais do estudo, não houve diferenças óbvias, nos tecidos afectados ou na gravidade das lesões, entre animais tratados com AN1792 e animais não tratados. Não se observaram lesões histopatológicas isoladas em animais imunizados com NA1782 comparativamente com animais tratados com PBS ou não tratados. Também não houve diferenças no perfil de química clínica entre grupos de adjuvante e os animais tratados com PBS no Exemplo 7. Apesar se observar aumentos significativos em vários parâmetros da hematologia entre animais tratados com AN1792 e adjuvante de Freund no Exemplo 7 relativamente aos animais tratados com PBS, este tipo de efeitos são esperados do

tratamento com adjuvante de Freund e na peritonite que o acompanha e não indica quaisquer efeitos adversos derivados do tratamento com AN1792. Ainda que não fazendo parte da avaliação toxicológica, a patologia do cérebro de murganhos PDAPP foi extensivamente avaliada como parte da eficácia final. Não foram observados sinais de efeitos adversos relacionados com o tratamento na morfologia do cérebro em qualquer um dos estudos. Estes resultados indicam que o tratamento com AN1792 é bem tolerado e pelo menos não implica efeitos secundários.

XI. Prevenção e Tratamento dos Indivíduos

Realizou-se a fase I de um ensaio clínico com uma única dose para avaliar a segurança. Foi administrado um agente terapêutico em dosagens crescentes a diferentes doentes, começando a partir de aproximadamente 0,01 do nível de presumível eficácia e aumentando por um factor de três até ser atingível um nível de aproximadamente 10 vezes a dosagem eficaz no murganho.

Realizou-se a fase II de um ensaio clínico para determinar a eficácia terapêutica. Foram seleccionados doentes com doença de Alzheimer precoce a média definida utilizando os critérios da Associação da Doença de Alzheimer e Distúrbios Relacionadas (ADRDA) relativamente a AD provável. Os doentes adequados foram avaliados na gama de 12-26 no Mini-Exame do Estado Mental (MMSE). Outros critérios de selecção são que os doentes tenham probabilidade de sobreviver durante a duração do estudo e não possuam outras complicações, tal como a utilização concomitante de medicações que possam interferir. As avaliações na linha de base da função do doente são feitas utilizando medições

psicométricas clássicas, tais como a MMSE e a ADAS, que é uma escala compreensiva para avaliação do estatuto e função dos doentes com Doença de Alzheimer. Estas escalas psicométricas proporcionam uma medida de progressão da condição de Alzheimer. Escalas de vida qualitativas adequadas podem igualmente ser utilizadas para monitorizar o tratamento. A progressão da doença pode também ser monitorizada por MRI. Os perfis sanguíneos dos doentes podem também ser monitorizados, incluindo ensaios de anticorpos específicos de imunogénios e respostas de células T.

Após as medições de linha de base, os doentes começaram a receber tratamento. Foram distribuídos aleatoriamente e tratados com agente terapêutico ou placebo de forma cega. Os doentes foram monitorizados pelo menos de seis em seis meses. A eficácia foi determinada através de uma redução significativa na progressão de um grupo de tratamento relativamente ao grupo placebo.

Foi realizado um segundo ensaio clínico de fase II para avaliar a conversão de doentes com perda de memória precoce não atribuída a Doença de Alzheimer, muitas vezes referido como perda de memória associada à idade (AAMI), para provável Doença de Alzheimer como definido pelos critérios de ADRDA. Os doentes com risco elevado de conversão em Doença de Alzheimer foram seleccionados de uma população não clínica através do rastreio de populações de referência relativamente a ensaios precoces de perda de memória ou outras dificuldades associadas a sintomatologia pré-Alzheimer, uma história familiar de Doença de Alzheimer, factores de risco genéticos, idade, sexo e outras características que se observou prenunciarem elevado risco de Doença de Alzheimer. Foram feitas avaliações da linha de base com parâmetros adequados incluindo os de MMSE e ADAS juntamente

com outros parâmetros destinados a avaliar uma população mais normal. Estas populações de doentes foram divididas em grupos adequados, com comparação do placebo contra alternativas de dosagem com o agente. Estas populações de doentes foram seguidas com intervalos de cerca de seis meses e ponto terminal para cada doente e quando da conversão em provável Doença de Alzheimer, conforme definido pelos critérios de ADRDA no final da observação.

XII. Materiais e Métodos Gerais

1. Medição de Títulos de Anticorpos

Recolheu-se sangue dos murganhos fazendo-se uma pequena incisão na veia da cauda e recolhendo cerca de 200 µL de sangue para um tubo de microcentrífuga. Foi recolhido sangue das cobaias barbeando primeiro a área do dorso e depois utilizando uma agulha de calibre 18 para perfurar a veia do metatarso e recolher o sangue em tubos de microcentrífuga. Deixou-se o sangue coagular durante uma hora à temperatura ambiente (T.A.), agitado com vórtex, depois centrifugado a 14000 xg durante 10 min para separar o coágulo do soro. O soro foi então transferido para um tubo de microcentrífuga limpo e guardado a 4 °C até ser titulado.

Os títulos de anticorpos foram medidos por ELISA. Placas de microtitulação de 96 poços (placas de EIA Costar) foram revestidas com 100 µL de uma solução contendo 10 µg/mL de Aβ42 ou SAPP ou outros antigénios conforme observado em cada uma das descrições individuais em Tampão de Revestimento de Poços (fosfato de sódio 0,1 M, pH 8,5, azida de sódio a 0,1%) e

mantidas de um dia para o outro à TA. Os poços foram aspirados e os soros foram adicionados numa diluição de 1/100 em Diluente da Amostra (fosfato de sódio 0,014 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, de albumina sérica bovina a 0,6%, timerosal a 0,05%). Foram feitas sete diluições em série das amostras, directamente nas placas, em passos de três vezes até atingir uma diluição final de 1/218700. As diluições foram incubadas em poços de placas revestidas durante uma hora à TA. As placas foram então lavadas quatro vezes com PBS contendo Tween 20 a 0,05%. O segundo anticorpo, IgG de cabra anti-murganho conjugados com peroxidase de rábano (adquirido à Boehringer Mannheim), foram adicionados aos poços como 100 µL de uma diluição de 1/3000 em Diluente da Amostra e incubados durante uma hora à TA. As placas foram novamente lavadas quatro vezes em PBS, Tween 20. Para o desenvolvimento da cor, foram adicionados 100 µL de TMB Lento (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina adquirida à Pierce Chemicals) a cada poço e foram incubados durante 15 min à TA. A reacção foi parada pela adição de 25 µL de H_2SO_4 2 M. A intensidade da cor foi então lida num leitor Molecular Devices Vmáx (a 450 nm-650 nm).

Os títulos foram definidos como o inverso da diluição de soro que proporciona metade da DO máxima. A DO máxima foi geralmente retirada a partir de uma diluição inicial de 1/100, excepto nos casos com títulos muito elevados, situação em que foi necessário uma diluição inicial mais elevada para estabelecer a DO máxima. Se o valor correspondente a 50% diminuiu entre duas diluições, foi feita uma extrapolação linear para calcular o título final. Para calcular a média geométrica dos títulos de anticorpos, aos títulos inferiores a 100 foi atribuído arbitrariamente um valor de título de 25.

2. Ensaio de Proliferação de Linfócitos

Os murganhos foram anestesiados com isoflurano. Os baços foram removidos e lavados duas vezes com 5 mL de PBS contendo soro bovino fetálico a 10% inactivado pelo calor (PBS-FBS) e depois homogeneizado numa unidade Centricon de 50 µm (Dako Ais, Dinamarca) em 1,5 mL de PBS-FBS durante 10 seg, a 100 rpm, num Medimachine (Dako), seguido de filtração através de uma rede de nylon de 100 µm de poro. Os esplenócitos foram lavados uma vez com 15 mL de PBS-FBS, depois sedimentados por centrifugação a 200 x g durante 5 min. Os eritrócitos foram lisados ressuspendendo o sedimento em 5 mL de tampão contendo NH_4Cl 0,15 M, $KHCO_3$ 1 M, NaEDTA 1,1 M, pH 7,4 durante cinco min à TA. Os leucócitos foram então lavados como atrás. Células do baço foram isoladas de fresco (10^5 células por poço), foram cultivadas em triplicado em placas de microtitulação de 96 poços de fundo em U, tratadas para cultura de tecidos (Corning, Cambridge, MA), em meio RPMI 1640 (JRH Biosciences, Lenexa, KS) suplementado com glutamina 2,05 mM, 1% de Penicilina/Estreptomicina e 10% de FBS inactivado pelo calor, durante 96 h, a 37 °C. Os vários péptidos Aβ, Aβ1-16, Aβ1-40, Aβ1-42 ou a proteína com a sequência reversa Aβ40-1 foram também adicionados em doses que variam entre 5 µm e 0,18 µm em quatro passos. As células nos poços de controlo foram cultivadas com Concanavalina A (Com A) (Sigma, cat. N° C-5275, a 1 µg/mL) sem adicionar proteína. As células foram incubadas durante as últimas 24 h com ^{3}H-timidina (1 µCi/poço adquirido à Amersham Corp., Arlington Heights IL). As células foram então colhidas em placas UniFilter e contadas num contador de cintilação Top Count Microplate (Packard Instruments, Downers Grove, IL). Os resultados são expressos como contagens por minuto (cpm) de radioactividade incorporada em macromoléculas solúveis.

4. Preparação de Tecido Cerebral

Após eutanásia, os cérebros foram removidos e um hemisfério foi preparado para análise imuno-histoquímica, enquanto que três regiões do cérebro (hipocampo, córtex e cerebelo) foram dissecadas do outro hemisfério e utilizadas para medir a concentração de várias proteínas Aβ e formas de APP utilizando ELISA específico (Johnson-Wood *et al.*, supra).

Os tecidos destinados a ELISA foram homogeneizados em 10 volumes de tampão guanidina arrefecido em gelo (guanidina-HCl 5,0 mM, Tris-HCI 50 mM, pH 8,0). Os homogenatos foram misturados por agitação suave utilizando um Adams Nutator (Fisher), durante três a quatro h, à TA, depois guardados a -20 °C antes da quantificação de Aβ e APP. Experiências anteriores demonstraram que os analitos eram estáveis nestas condições de armazenamento e que a proteína sintética Aβ (Bachem) poderá ser quantitativamente recuperada quando dispersa em homogenatos de tecido cerebral de controlo derivado de ninhadas de recém-nascidos (Johnson-Wood *et al.*, supra).

5. Medição dos Níveis de Aβ

Os homogenatos de cérebro foram diluídos a 1:10 com Diluente de Caseína arrefecido em gelo (caseína a 0,25%, PBS, azida de sódio a 0,05%, aprotinina a 20 µg/mL, EDTA 5 mM, pH 8, 0,10 µg/mL de leupeptina) e depois centrifugados a 16000 x g durante 20 min a 4 °C. Os padrões de proteína Aβ sintética (1-42 aminoácidos) e os padrões de APP foram preparados para incluir guanidina 0,5 M e albumina sérica bovina a 0,1% (BSA) na composição final. A sanduíche "total" de Aβ utiliza o anticorpo

monoclonal (mAp) 266, específico para os aminoácidos 13-28 de Aβ (Seubert, *et al.*), como anticorpo de captura e o mAp 3D6 biotinilado, específico para aminoácidos 1-5 de Aβ (Johnson-Wood, *et al.*), como anticorpo repórter. O mAβ 3D6 não reconhece APP secretado ou APP de tamanho completo, mas detecta apenas espécies Aβ com um ácido aspártico no terminal amina. Este ensaio tem um limite inferior de sensibilidade de ~50 pg/mL (11 pM) e não apresenta reactividade cruzada com a proteína Aβ endógena murina a concentrações de 1 ng/mL (Johnson-Wood *et al.*, *supra*).

O ELISA tipo sanduíche específico de Aβ emprega o mAβ 21F12, específico dos aminoácidos 33-42 de Aβ (Johnson-Wood, *et al.*), como anticorpo de captura. O mAβ 3D6 biotinilado é igualmente o anticorpo repórter neste ensaio que tem um limite inferior de sensibilidade de aproximadamente 125 pg/mL (28 pM, Johnson-Wood *et al.*). Para os ELISA de Aβ, 100 µL do mAβ 266 (a 10 µg/mL) ou do mAβ 21F12 (a 5 µg/mL) foi utilizado para revestir os poços de placas de imunoensaio de 96 poços (Costar) através de incubação de um dia para o outro, à TA. A solução foi removida por aspiração e os poços foram bloqueados pela adição de 200 µL de albumina sérica bovina em tampão PBS durante pelo menos 1 h à TA. A solução de bloqueio foi removida e as placas foram guardadas na ausência de humidade a 4 °C até serem utilizadas. As placas foram re-hidratadas com Tampão de Lavagem [solução salina tamponado com Tris (NaCl 0,15 M, Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5), mais 0,05% de Tween 20 antes de utilizar. As amostras e padrões foram adicionados em triplicados de aliquotas de 100 µL por poço e depois incubados, de um dia para o outro, a 4 °C. As placas foram lavadas, pelo menos, três vezes com Tampão de Lavagem entre cada passo do ensaio. O mAβ 3D6 biotinilado, diluído para 0,5 µg/mL em Tampão de Ensaio com Caseína (caseína

a 0,25%, PBS, Tween 20 a 0,05%, pH 7,4) foi adicionado e incubado nos poços durante 1 h à TA. Um conjugado de avidina-peroxidase de rábano, (Avidin-HRP adquirido à Vector, Burlingame, CA), diluído a 1:4000 em Tampão de Ensaio com Caseína, foi adicionado aos poços durante 1 h à TA. O substrato colorimétrico, Slow TMB-ELISA (Pierce), foi adicionado e deixado a reagir durante 15 minutos à TA, após o que a reacção enzimática foi parada pela adição de 25 µL de H_2SO_4 2 N. O produto de reacção foi quantificado utilizando o equipamento Molecular Devices Vmax que mede a diferença na absorvância a 450 nm e a 650 nm.

6. Medição dos Níveis de APP

Foram utilizados dois ensaios de APP diferentes. O primeiro, designado AAP-α/FL, reconhece AAP-alfa (α) e as formas de tamanho completo (FL) de APP. O segundo ensaio é específico de AAP-α. O ensaio de AAP-α/FL reconhece APP secretada incluindo os 12 primeiros aminoácidos de Aβ. Uma vez que o anticorpo repórter (2H3) não é específico do local "α-clip", ocorrendo entre os aminoácidos 612-613 de APP695 (Esch *et al.*, Science 248, 1122-1124 (1990)); este ensaio também reconhece APP de tamanho completo (APP-FL). Experiências preliminares, utilizando anticorpos APP imobilizados contra a cauda citoplasmática de APP-FL imobilizados para remover APP-FL dos homogenatos de cérebro, sugerem que aproximadamente 30-40% do AAP-α/FLAPP é FL (dados não mostrados). O anticorpo de captura para os ensaios APP-a/FL e os ensaios AAP-α é o mAβ 8E5, induzido contra os aminoácidos 444 a 592 da forma APP695 (Games *et al.*, *supra*). O mAβ repórter para o ensaio AAP-α/FL é o mAβ 2H3, específico dos aminoácidos 597-608 de APP695 (Johnson-Wood *et al.*, *supra*) e o

anticorpo repórter para o ensaio de APP-α é um derivado biotinilado de mAβ 16H9, induzido contra os aminoácidos 605 a 611 de APP. O limite inferior de sensibilidade do ensaio AAP-α/FL é cerca de 11 ng/mL (150 pM) (Johnson-Wood *et al.*) e o do ensaio específico de AAP-α é 22 ng/mL (0,3 nM). Para ambos os ensaios APP, o mAβ 8E5 foi utilizado para revestir os poços de placas de ElA de 96 poços como descrito atrás para o mAβ 266. AAP-α recombinante, secretado e purificado foi utilizado como padrão de referência para o ensaio de AAP-α e o ensaio de APP-α/FL (Esch *et. al.*, supra). As amostras de homogenato de cérebro, em guanidina 5 M, foram diluídas, a 1:10, em Diluente da Amostra para ELISA (tampão de fosfatos 0,014 M, pH 7,4, albumina sérica bovina a 0,6%, timerosal a 0,05%, NaCl 0,5 M, NP40 a 0,1%). Foram depois diluídas a 1:4 em Diluente da Amostra contendo guanidina 0,5 M. Os homogenatos diluídos foram então centrifugados a 16000 x g durante 15 segundos à TA. Os padrões de APP e as amostras foram adicionadas à placa em duplicado e incubados durante 1,5 h à TA. O anticorpo repórter biotinilado 2H3 ou 16H9 foi incubado com amostras durante 1 h à TA. A estreptavidina-fosfatase alcalina (Boehringer Mannheim), diluída a 1:1000 em diluente da amostra, foi incubada nos poços durante 1 h à TA. O substrato fluorescente 4-metil-umbeliferil-fosfato foi adicionado para uma incubação durante 30 min à TA e as placas foram lidas num fluorímetro Cytofluor tm 2350 (Millipore) a 365 nm de excitação e 450 nm de emissão.

7. Imuno-histoquímica

Os cérebros foram fixados durante três dias em paraformaldeído a 4% em PBS e depois guardados de um a sete dias a 4 °C em paraformaldeído a 1% até serem cortados. Secções

coronais de quarenta microns de espessura foram cortadas num vibratomo à TA e guardadas em crioprotector (glicerol a 30%, etilenoglicol a 30% e tampão de fosfatos) a -20 °C antes do processamento histoquímico. Para cada cérebro, seis secções ao nível do hipocampo dorsal, cada uma delas separada por intervalos consecutivos de 240 µm, foram incubadas, de um dia para o outro, com um dos seguintes anticorpos: (1) um anticorpo anti-Aβ biotinilado (mAβ, 3D6, específico para Aβ humano) diluído para uma concentração de 2 µg/mL em PBS e de soro de cavalo a 1%; ou (2) um mAβ biotinilado específico de APP humano, 8E5, diluído para uma concentração de 3 µg/mL em PBS e soro de cavalo a 1,0%; ou (3) um mAβ específico da proteína acídica fibrilhar da glia (GFAP; Sigma Chemical Co.) diluída a 1:500 com 0,25% de Triton X-100 e soro de cavalo a 1%, em solução salina tamponado com Tris, pH 7,4 (TBS); ou (4) um mAβ específico de CD11b, antigénio MAC-1), (Chemicon International) diluído a 1:100 com Triton X-100 a 0,25% e soro de coelho a 1% em TBS; ou (5) um mAβ específico para o antigénio MHC II, (Pharmingen) diluído a 1:100 com Triton X-100 a 0,25% e soro de coelho a 1% em TBS; ou (6) um mAβ de rato específico para CD43 (Pharmingen) diluído a 1:100 com soro de coelho a 1% em PBS ou (7) um mAβ de rato específico para CD 45RA (Pharmingen) diluído a 1:100 com soro de coelho a 1% em PBS; ou (8) um Aβ monoclonal de rato específico para CD45RB (Pharmingen) diluído a 1:100 com soro de coelho a 1% em PBS; ou (9) um Aβ monoclonal de rato específico para CD45 (Pharmingen) diluído a 1:100 com soro de coelho a 1% em PBS; ou (10) um Aβ policlonal biotinilado de cobaio específico para CD3e (Pharmingen) diluído a 1:100 com soro de coelho a 1% em PBS ou (11) um mAβ de rato específico para CD3 (Serotec) diluído a 1:200 com soro de coelho a 1% em PBS; ou com (12) uma solução de PBS sem um anticorpo primário contendo soro normal de cavalo a 1%.

As secções reagiram com as soluções de anticorpos referidas em 1,2 e 6-12 atrás foram pré-tratadas com 1,0% de Triton X-100, peróxido de hidrogénio a 0,4% em PBS durante 20 min, à TA, para bloquear a peroxidase endógena. Foram em seguida incubadas de um dia para o outro a 4 °C com anticorpo primário. As secções que reagiram com os mAβ 3D6 ou 8E5 ou CD3e reagiram então durante uma hora à TA com um complexo de peroxidase de rábano -avidina-biotina com os componentes do kit "A" e "B" diluídos a 1:75 em PBS (vector Elite Standard kit, Vector Labs, Burlingame, CA). As secções reagiram com anticorpos específicos para CD 45RA, CD 45RB, CD 45, CD3 e a solução de PBS sem o anticorpo primário, foram incubados durante 1 hora, à TA, com anti-IgG de rato biotinilado (Vector) diluído a 1:75 em PBS ou anticorpos anti-IgG de murganho biotinilados (Vector) diluído a 1:75 em PBS, respectivamente. As secções foram então incubadas durante uma hora à TA com o complexo peroxidase de rábano-avidina-biotina com os componentes do kit "A" e "B" diluídos a 1:75 em PBS (Vector Elite Standard Kit, Vector Labs, Burlingame, CA).

As secções foram reveladas em peróxido de hidrogénio a 0,01%, 3,3'-diaminobenzidina (DAB) a 0,05% à TA. As secções destinadas à incubação com os anticorpos específicos de GFAP, NAC-1 e MHC II foram pré-tratadas com peróxido de hidrogénio a 0,6% à TA para bloquear a peroxidase endógena, depois incubadas durante a noite com o anticorpo primário a 4 °C. As secções que reagiram com o anticorpo GFAP foram incubadas durante 1 h à TA com anticorpos anti-IgG de murganho biotinilados preparados em cavalo (Vector Laboratories; Vectastain Elite ABC Kit) diluído a 1:200 com TBS. Em seguida, as secções foram reagidas durante uma h com um complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories; Vectastain Elite ABC kit) diluído a 1:1000 com TBS. As secções incubadas com os mAβ específicos de MAC-1 ou

MHC II como o anticorpo primário reagiram subsequentemente durante 1 h à TA com anticorpos anti-IgG de rato biotinilados produzidos em coelho, diluídos a 1:200 com TBS, seguido de incubação durante uma hora com o complexo de avidina-biotina-peroxidase diluído a 1:1000 com TBS. As secções incubadas com anticorpos específicos de GFAP, MAC-1 e MHC II foram então visualizados por tratamento à TA com DAB a 0,05%, peróxido de hidrogénio a 0,01%, cloreto de níquel a 0,04%, TBS durante 4 e 11 min, respectivamente.

As secções marcadas imunologicamente foram montadas em lâminas de vidro (VWR, lâminas Superfrost), secas ao ar durante a noite, mergulhadas em Propar (Anatech) e cobertas com lamelas utilizando Permount (Fisher) como meio de montagem.

Para contrastar as placas Aβ, uma subsérie das secções positivas para GFAP foi montada em lâminas Superfrost e incubadas em Thioflavin S a 1% aquoso (Sigma) durante 7 min após processamento imuno-histoquímico. As secções foram então desidratadas e mergulhadas em Propar, depois cobertas com lamelas montadas com Permount.

8. Análise de Imagens

Utilizou-se um sistema de análise de imagens Video-metric 150 (Oncor, Inc., Gaithersburg, MD) ligado a um microscópio Nikon Microphot-FX através de uma câmara de vídeo CCD e de um monitor Sony Trinitron para a quantificação das lâminas com reactividade imunológica. A imagem da secção foi guardada num tampão de vídeo e determinado um patamar baseado em cor e saturação para seleccionar e calcular a área total de pixéis

ocupada pelas estruturas marcadas imunologicamente. Para cada uma das secções, o hipocampo foi marcado manualmente e calculada a área total de pixéis ocupada pelo hipocampo. A percentagem de desenvolvimento amilóide foi medida como: (a fracção da área do hipocampo contendo depósitos Aβ que reagiram imunologicamente com o mAβ 3D6) x 100. De forma semelhante, a percentagem de desenvolvimento neurítico foi medida como: (a fracção da área do hipocampo contendo neurites distróficas reactivas com mAβ 8E5) x 100. O C-Imaging System (Compix, Inc., Cranberry Township, PA) funcionando com o programa Simple 32 Software Application foi ligado a um microscópio Nikon Microphot-FX através de uma câmara Optronics e utilizado para quantificar a percentagem de córtex retroesplenial ocupado por astrócitos positivos para GFAP e MAC-1 e microglia positiva para MHC II. A imagem da secção que reagiu imunologicamente foi guardada num tampão de vídeo e determinado um patamar baseado em monocromo para seleccionar e calcular a área total de pixéis ocupada pelas células marcadas imunologicamente. Para cada secção, o córtex retroesplenial (RSC) foi marcado manualmente e a área total de pixéis ocupada pelo RSC foi calculada. A percentagem de astrocitose foi definida como: (a fracção de RSC ocupada por astrócitos reactivos com GFAP) x 100. De forma semelhante, a percentagem de microgliose foi definida como: (a fracção da RSC ocupada por microglia que reage com MAC-1 ou MHC II) x 100. Para todas as análises de imagens, seis secções ao nível do hipocampo dorsal, cada separada por intervalos consecutivos de 240 µm, foram quantificadas para cada animal. Em todos os casos, o estatuto de tratamento dos animais não era conhecido do observador.

Embora a presente invenção tenha sido descrita em detalhe com objectivos de clareza e compreensão, será óbvio que podem

ser efectuadas certas modificações dentro do âmbito das reivindicações em anexo

Tabela 1

				Título a 50% da DO máxima					
				Aβ agregado injectado em murganhos					
Idade de PDAPP	Murga-nho 100	Murga-nho 101	Murga-nho 102	Murga-nho 103	Murga-nho 104	Murga-nho 105	Murga-nho 106	Murga-nho 107	Murga-nho 108
4	70000	150000	15000	120000	1000	15000	50000	80000	100000
6	15000	65000	30000	55000	300	15000	15000	50000	60000
8	20000	55000	50000	50000	400	15000	18000	50000	60000
10	40000	20000	60000	50000	900	15000	50000	20000	40000
12	25000	30000	60000	40000	2700	20000	70000	25000	20000
			Murganhos injectados com PBS em ambos os imunogénios a 1/100						
		Idade de PDAPP	Murganho 113	Murganho 114	Murganho 115	Murganho 116	Murganho 117		
		6	<4x bKg	<4x bKg	<4x bKg	<4x bKg	<4x bKg		
		10	5 x bKg	<4x bKg	<4x bKg	<4x bKg	<4x bKg		
		12	<4x bKg	<4x bKg	<4x bKg	<4x bKg	<4x bKg		

Lisboa, 11 de Fevereiro de 2011

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica compreendendo um anticorpo contra Aβ e um veículo ou diluente não tóxico farmaceuticamente aceitável, para utilização na prevenção ou tratamento de uma doença caracterizada por depósito amilóide num doente, em que o isotipo do anticorpo é a IgG1 humana.

2. Composição farmacêutica para utilização na prevenção ou tratamento de uma doença caracterizada por depósito amilóide num doente da reivindicação 1, em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

3. Composição farmacêutica para utilização na prevenção ou tratamento de uma doença caracterizada por depósito amilóide num doente da reivindicação 1, em que o anticorpo é um anticorpo humanizado ou um anticorpo humano.

4. Composição farmacêutica para utilização na prevenção ou tratamento de uma doença caracterizada por depósito amilóide num doente de qualquer reivindicação anterior, em que o anticorpo se liga especificamente à forma agregada do péptido Aβ sem se ligar à forma dissociada.

5. Composição farmacêutica para utilização na prevenção ou tratamento de uma doença caracterizada por depósito amilóide num doente de qualquer das reivindicações 1-3, em que o anticorpo se liga especificamente à forma dissociada do péptido Aβ sem se ligar à forma agregada.

6. Composição farmacêutica para utilização na prevenção ou tratamento de uma doença caracterizada por depósito amilóide num doente de qualquer das reivindicações 1-3, em que o anticorpo se liga a ambas as formas agregada e dissociada do péptido Aβ.

7. Composição farmacêutica para utilização na prevenção ou tratamento de uma doença caracterizada por depósito amilóide num doente de qualquer das reivindicações anteriores, em que o depósito amilóide compreende o péptido Aβ agregado.

8. Composição farmacêutica para utilização na prevenção ou tratamento de uma doença caracterizada por depósito amilóide num doente de qualquer das reivindicações anteriores, em que o doente é um humano.

9. Composição farmacêutica para utilização na prevenção ou tratamento de uma doença caracterizada por depósito amilóide num doente de qualquer das reivindicações anteriores, em que a doença é a doença de Alzheimer.

10. Composição farmacêutica para utilização na prevenção ou tratamento de uma doença caracterizada por depósito amilóide num doente de qualquer das reivindicações anteriores, em que o doente é assintomático, opcionalmente, em que o doente tem menos de 50 e/ou tem factores de risco inerentes indicando susceptibilidade à doença de Alzheimer.

11. Composição farmacêutica para utilização na prevenção ou tratamento de uma doença caracterizada por depósito amilóide num doente de qualquer das reivindicações anteriores, em que o anticorpo é administrado oralmente, subcutaneamente,

intramuscularmente, topicamente ou intravenosamente.

12. Composição farmacêutica para utilização na prevenção ou tratamento de uma doença caracterizada por depósito amilóide num doente de qualquer das reivindicações anteriores, em que o anticorpo é administrado a uma dosagem de cerca de 0,01 a 5 mg/kg do peso corporal do hospedeiro.

13. Composição farmacêutica para utilização na prevenção ou tratamento de uma doença caracterizada por depósito amilóide num doente de qualquer das reivindicações anteriores, que é administrado por uma primeira imunização seguida de reforço com intervalo de 6 semanas, ou que é administrado por uma primeira imunização seguida por reforços, 1, 2 e 12 meses depois ou que é administrada a cada dois meses de vida.

14. Método *in vitro* de monitorização da doença de Alzheimer ou com susceptibilidade a esta num doente, compreendendo: detecção de um anticorpo que se liga especificamente ao péptido Aβ numa amostra do doente, em que uma composição farmacêutica, como referida em qualquer das reivindicações 1-6, eficaz para o tratamento ou prevenção da doença de Alzheimer, foi administrada ao doente e o nível do anticorpo detectado determina o futuro regime de tratamento do doente.

15. Método *in vitro* de avaliação da eficácia de um método de tratamento da doença de Alzheimer num doente, compreendendo a determinação de um valor para uma quantidade de anticorpo específico para o péptido Aβ, numa amostra de tecido de um doente que foi tratado com uma composição farmacêutica, como apresentada em qualquer das reivindicações 1-6;

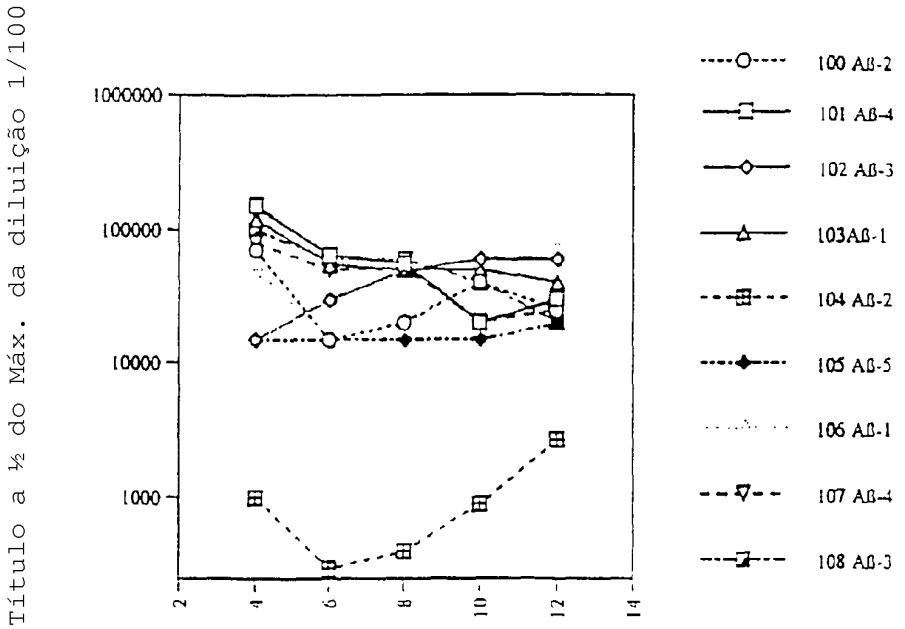
comparação do valor com um valor de controlo determinado a partir de uma população de doentes que apresentam melhorias ou que estão livres de sintomas da doença de Alzheimer devido ao tratamento com o anticorpo, como apresentado em qualquer das reivindicações 1-6;

em que um valor no doente, pelo menos, igual ao valor de controlo, indica uma resposta positiva ao tratamento.

Lisboa, 11 de Fevereiro de 2011

FIGURA 1

Título dos murganhos PDAPP injectados com Aβ42 agregado ao longo do tempo



Idade dos murganhos PDAPP (meses)

FIGURA 2

Estudo 001

Desenvolvimento amilóide no hipocampo

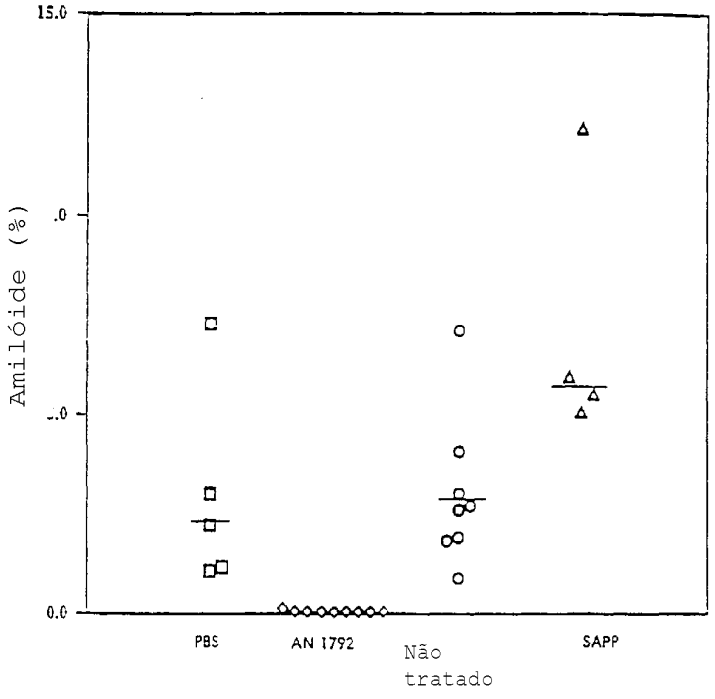


Figura 3

Estudo 001

DESENVOLVIMENTO DE PLACAS NEURÍTICAS NO HIPOCAMPO

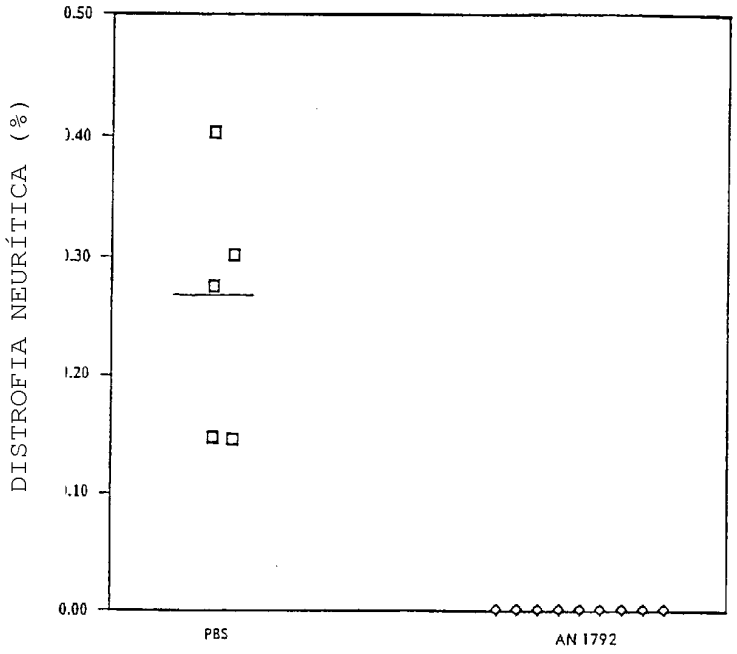


Figura 4

Estudo 001

ASTROCITOSE CORTICAL RETROESPLENIAL

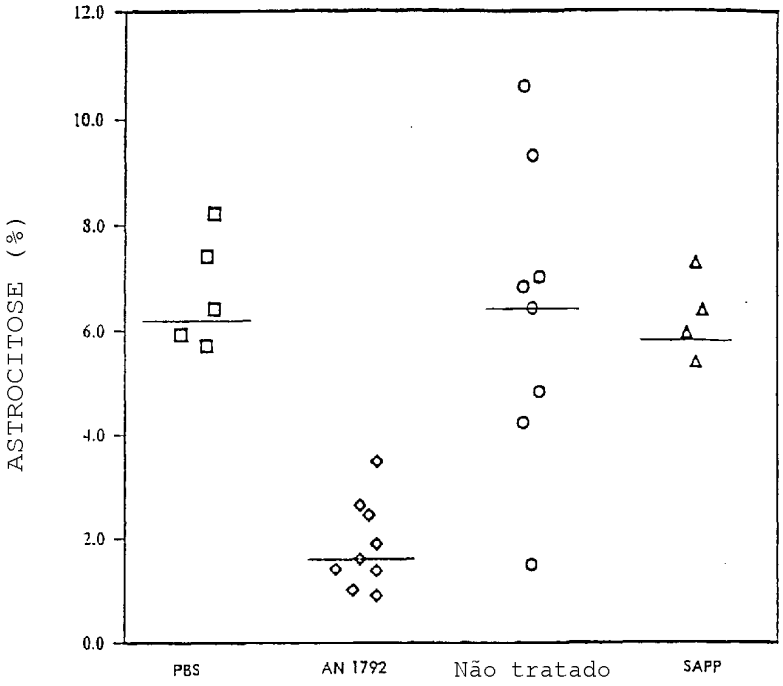


Figura 5

Título de anticorpo da resposta a várias doses de AN 1792 após 2, 3 e 4 imunizações

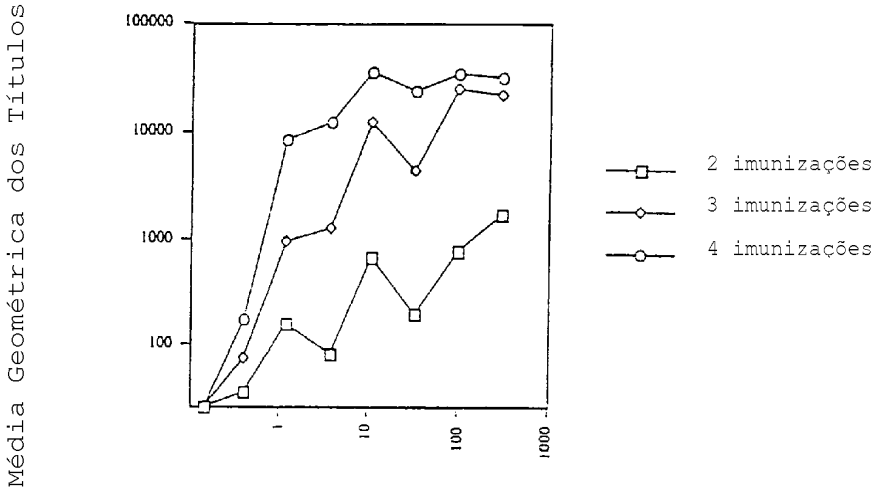


Figura 6

Cinéticas da Resposta por Anticorpos a AN1792

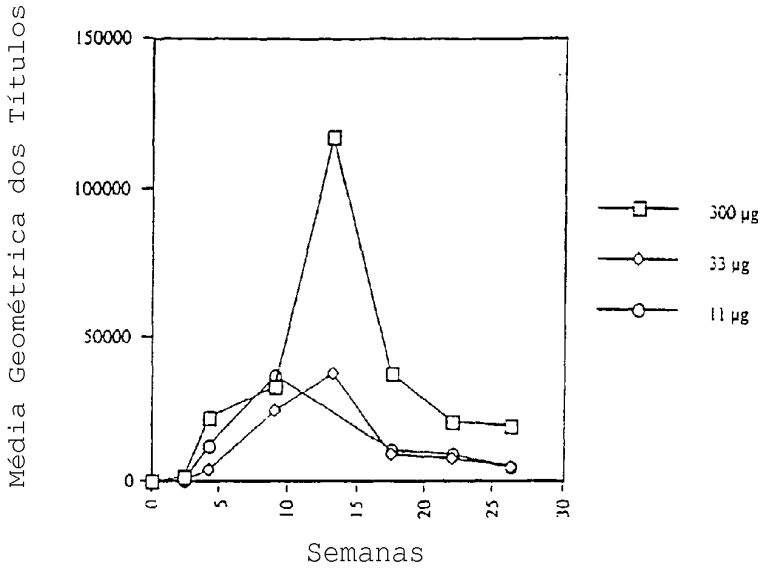


Figura 7

ESTUDO 002

DESENVOLVIMENTO AMILÓIDE CORTICAL

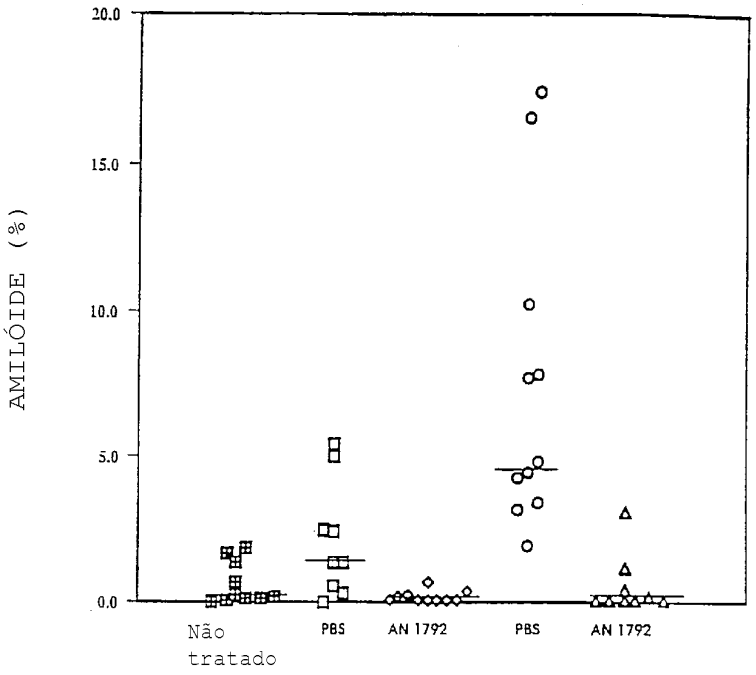
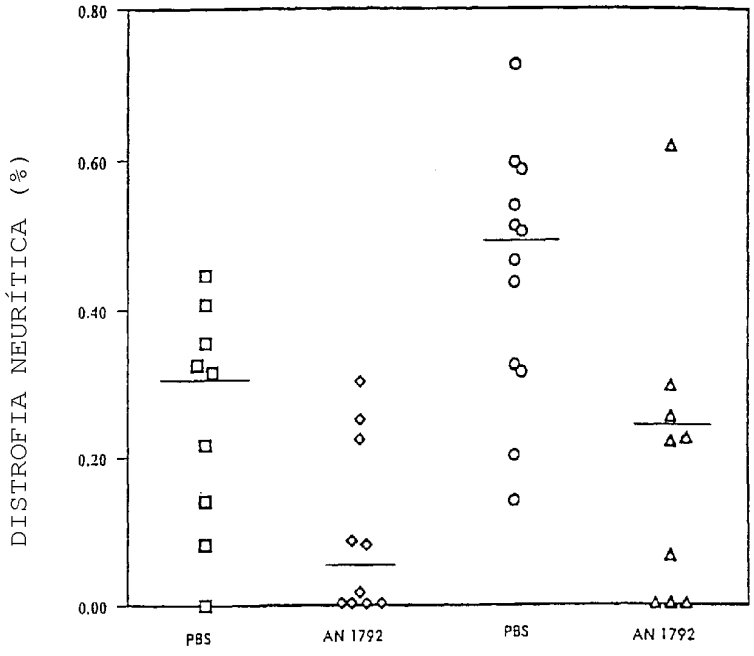


Figura 8

ESTUDO 002

DESENVOLVIMENTO DE PLACAS NEURÍTICAS CORTICAIS



15° Mês 18° Mês

Figura 9

ESTUDO 002

ASTROCITOSE CORTICAL RETROSPLENIAL

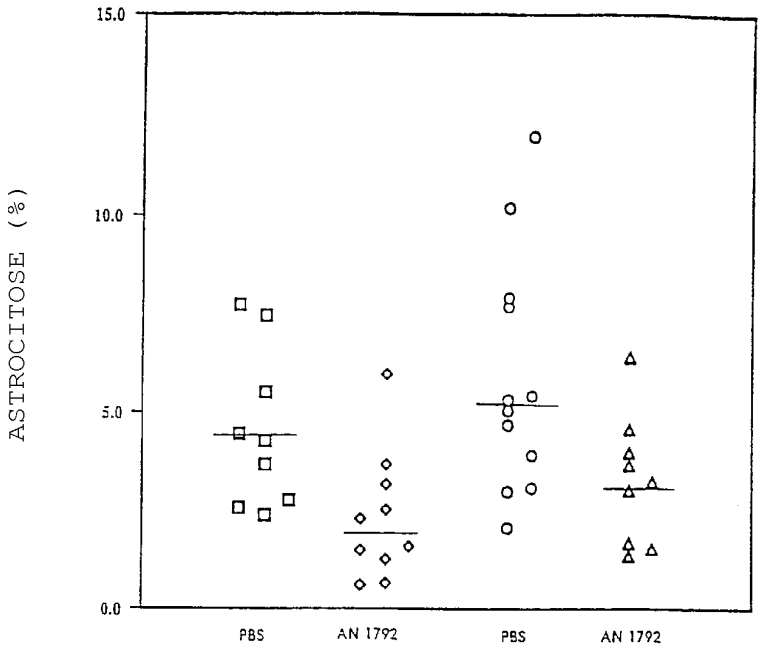
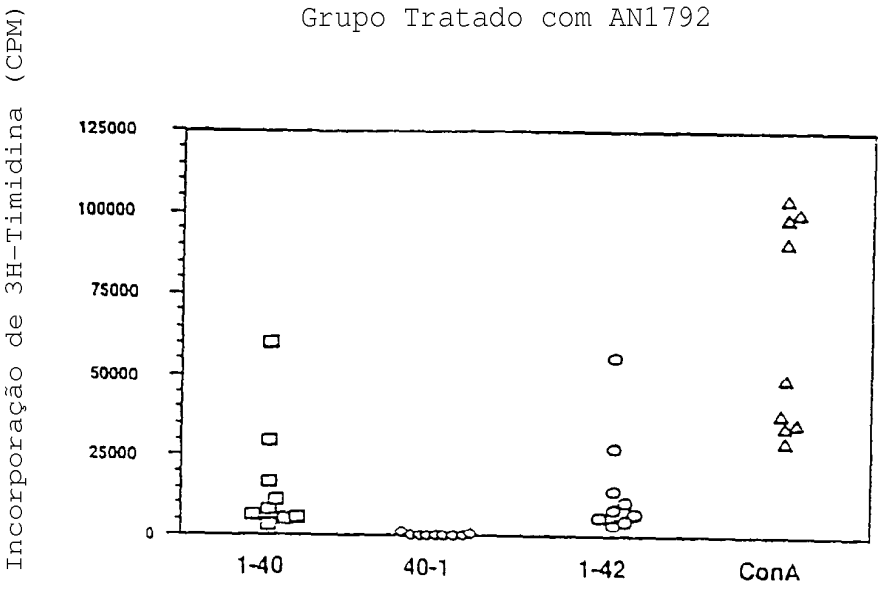


Figura 10

Estudo 002: Ensaio de Proliferação de Esplenócitos

Grupo Tratado com AN1792



Grupo Tratado com PBS

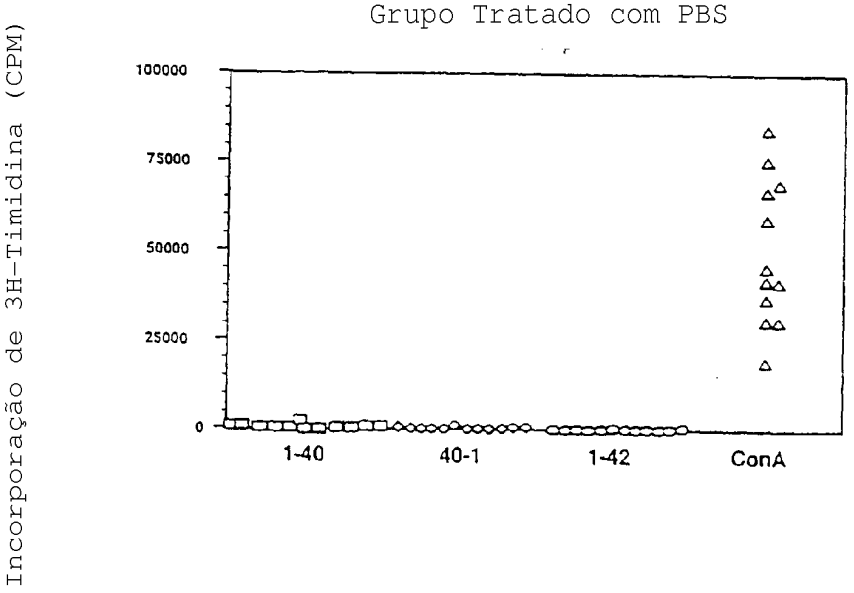
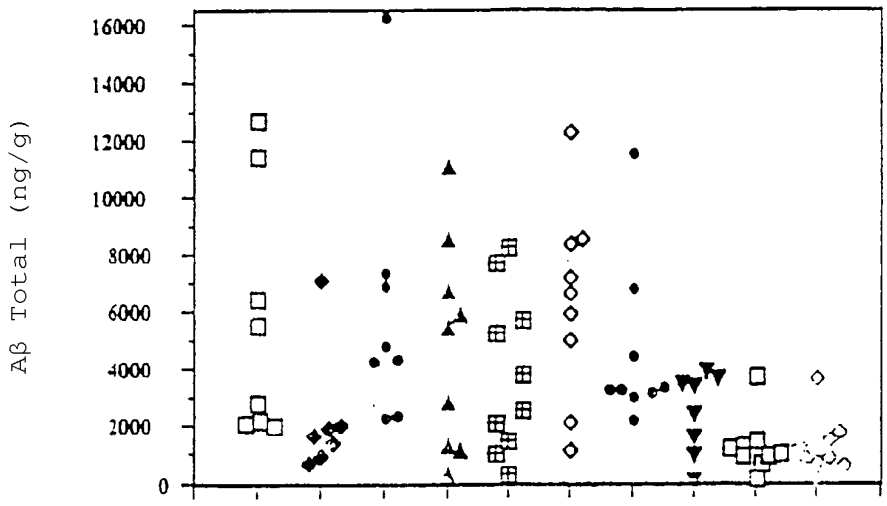


Figura 11

Estudo 006

Eficácia Terapêutica dos Fragmentos Aβ

Dados de Aβ Total Cortical



Grupo de Tratamento

Figura 12

ESTUDO 006

DESENVOLVIMENTO AMILÓIDE CORTICAL

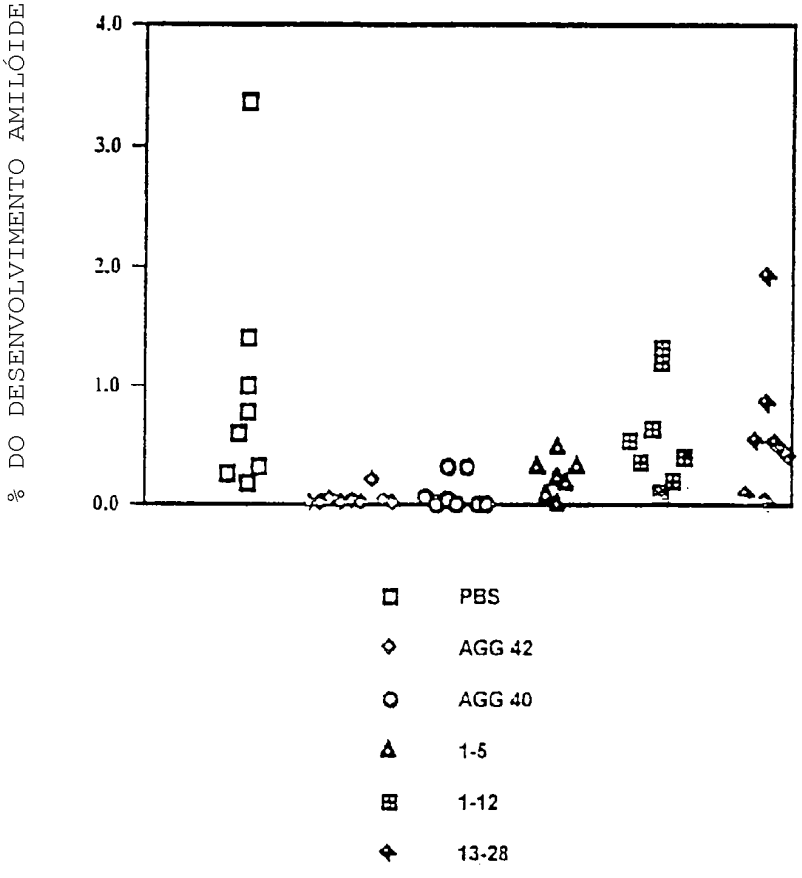


Figura 13

Estudo 006

Títulos de anticorpos que se ligam a AB1-42

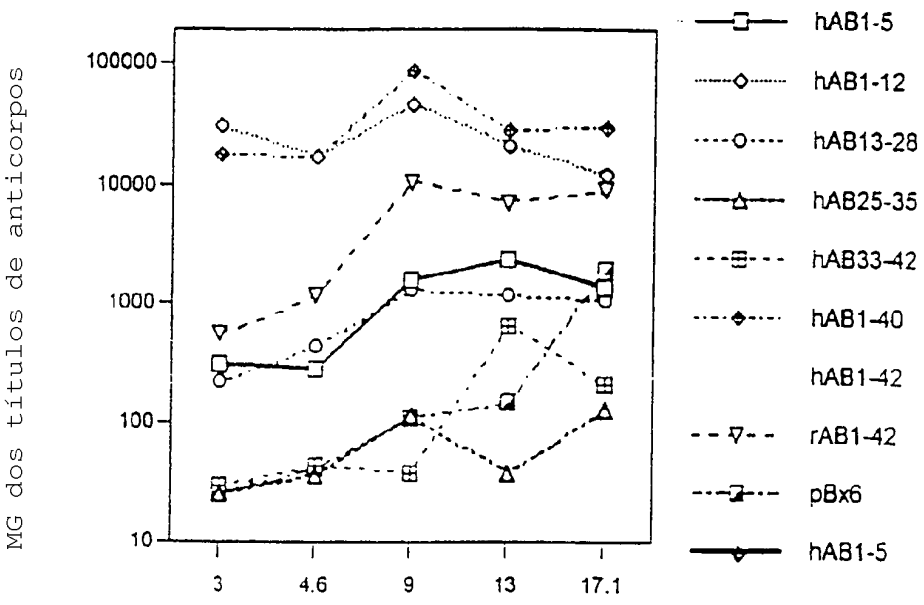
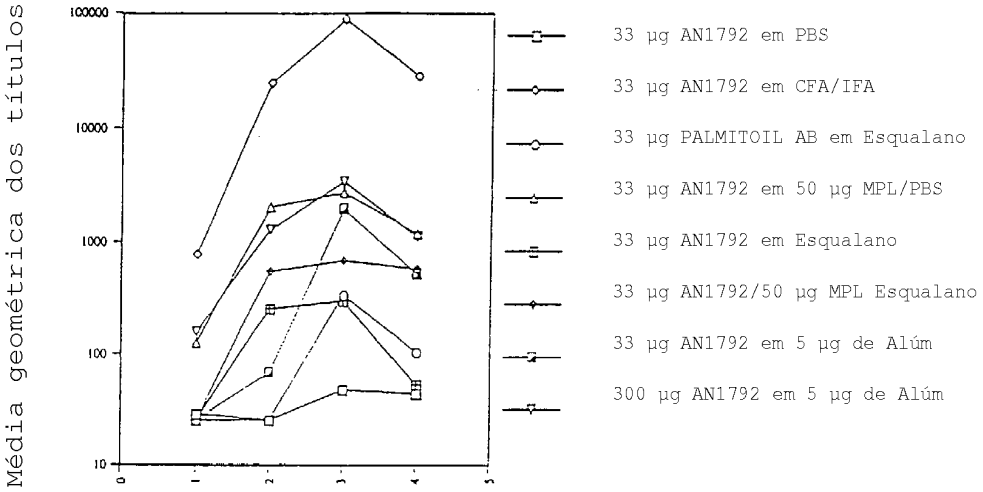


Figura 14

Respostas por anticorpos contra AN1792 com diferentes adjuvantes



N° de recolha de sangue

CÓRTEX

Controlo de PBS		Controlo não tratado	
624-165	272	764-181	3470
625-166	1802	785-182	171
626-167	62	766-183	91
633-168	4696	767-184	6692
634-169	3090	768-185	1353
671-170	2417	771-186	1153
672-171	2840	772-187	3800
829-172	3320	780-188	3740
830-173	1833	843-189	163
831-174	416	844-190	122
792-175	126	845-191	427
793-176	2559	846-192	2674
794-177	289	887-193	453
732-178	179	888-194	2996
733-179	1329	889-195	1075
734-180	5665		
Média	1817	Média	1153
valor de p (M-W)		valor de p (M-W)	
Média	1931	Média	1825
Des.Pad.	1718	Des.Pad.	1769
% CV	89	% CV	97
Valor de p (teste de t)		Valor de p (teste de t)	
	n=16		n=15

FIG. 15A

CÓRTEX

2 mg de ALUM 100 µg AN1528		50 µg de ALUM 100 µg AN1528	
660-083	295	643-105	385
661-084	3180	644-106	2640
662-085	2480	645-107	2403
633-086	3014	654-108	1741
664-087	5870	655-109	3053
665-088	5978	656-110	5990
693-089	1620	678-111	3360
694-090	35	679-112	1230
695-091	3400	704-114	2680
697-092	2630	705-115	78
698-093	983	706-116	1290
699-094	5327	729-117	3180
701-095	1862	730-118	1833
702-096	1849	731-119	4590
703-097	2239	736-120	1112
739-098	806	737-121	1653
740-099	5303	757-122	992
741-100	459	758-123	4692
800-103	154	808-124	785
801-104	852	809-125	244
		810-126	32
Média	2051	Média	1741
valor de p (M-W)		valor de p (M-W)	
Média	2407	Média	2141
Des.Pad.	1913	Des.Pad.	1659
% CV	79	% CV	78
Valor de p (teste de t)		Valor de p (teste de t)	
	n=20		n=21

FIG. 15B

CÓRTEX

25 µg de QS21 100 µg AN1528		CFA/IFA 100 µg AN1792	
615-128	1257	539-068	693
616-129	361	640-069	508
617-130	1008	641-070	440
536-131	3290	642-071	467
637-132	2520	690-072	42
638-133	3880	691-073	2491
744-134	627	692-074	121
745-135	58	795-075	137
746-136	2610	796-076	822
747-137	1509	797-077	475
769-138	1788	748-087	600
770-139	988	749-079	78
773-140	1199	750-080	1267
774-141	339	751-081	1351
775-142	402	761-082	69
776-143	537		
840-144	1119		
841-145	194		
821-146	1259		
822-147	5413		
823-148	2233		
Média	1199	Média	475
valor de p (M-W)		valor de p (M-W)	0,0481
Média	1552	Média	637
Des.Pad.	1364	Des.Pad.	655
% CV	88	% CV	103
Valor de p (teste de t)		Valor de p (teste de t)	0,0106
	n=21		n=15

FIG. 15C

CÓRTEX

5 µg de TIMEROSAL/PBS 100 µg AN1792		2 mg de ALUM 100 µg AN1792	
635-149	1337	610-001	432
669-150	4644	611-002	1012
670-151	6335	612-003	3607
673-152	3700	613-004	508
674-153	2750	620-005	465
676-154	1687	621-006	16
681-156	185	622-007	28
682-157	8031	623-008	217
683-158	3450	708-009	2738
754-159	157	709-010	927
755-160	6857	710-011	1609
756-161	482	716-012	1608
805-162	524	784-014	3890
806-163	397	785-015	1614
807-164	234	786-018	285
		787-017	3102
		788-018	1617
		789-019	1474
		815-020	424
		816-021	1375
		817-022	2323
Média	1687	Média	1375
valor de p (M-W)		valor de p (M-W)	0,5000
Média	2718	Média	1394
Des.Pad.	2685	Des.Pad.	1166
% CV	99	% CV	84
Valor de p (teste de t)		Valor de p (teste de t)	0,2650
	n=15		n=21

FIG. 15D

CÓRTEX

50 µg de MPL 100 µg AN1792		25 µg de QS21 100 µg AN1792	
646-023	2002	627-045	91
647-024	147	628-046	3397
648-025	1304	631-049	3702
649-026	34	632-050	1776
650-027	980	667-052	1832
724-028	1282	668-053	3023
726-030	1966	686-054	189
727-031	733	687-055	891
720-032	2563	688-056	240
721-033	5563	689-057	110
802-034	113	712-059	3311
803-035	671	825-061	1009
804-036	51	826-082	18165
811-037	613	827-063	73
812-038	332	828-064	78
813-039	1454	837-065	1051
814-040	2441	838-066	270
833-014	742	839-067	371
834-042	40		
836-044	807		
Média	774	Média	950
valor de p (M-W)	0,1710	valor de p (M-W)	0,4076
Média	1192	Média	2199
Des.Pad.	1299	Des.Pad.	4187
% CV	109	% CV	190
Valor de p (teste de t)	0,1506	Valor de p (teste de t)	0,8131
	n=21		n=18

FIG. 15E

RESUMO

"PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE DOENÇA AMILOIDOGÉNICA"

A invenção proporciona composições e métodos para o tratamento de doenças amiloidogénicas. Tais métodos caracterizam-se pela administração de um agente que induz uma reposta imunitária benéfica contra um depósito amilóide no doente. Os métodos são particularmente úteis para o tratamento profilático e terapêutico da doença de Alzheimer. Em tais métodos, um agente adequado é o péptido Aβ ou um anticorpo contra o mesmo.