

(22) Data de pedido: **2000.06.01**

(30) Prioridade(s): **1999.06.01 US 137010 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2002.03.13**

(45) Data e BPI da concessão: **2011.01.19**
076/2011

(73) Titular(es):

NEOTOPE BIOSCIENCES LIMITED

MONKSLAND ATHLONE WESTMEATH

IE

(72) Inventor(es):

DALE B. SCHENK

US

(74) Mandatário:

MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA

AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE DOENÇAS AMILOIDOGÉNICAS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO DIZ RESPEITO A COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E A MÉTODOS PARA A PREVENÇÃO E PARA O TRATAMENTO DE DIVERSAS DOENÇAS AMILÓIDES, INCLUINDO A DOENÇA DE ALZHEIMER, DOENÇAS DO PRIÃO, NEUROPATIAS AMILÓIDES FAMILIARES E SEMELHANTES. AS COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDEM QUANTIDADES IMUNOLOGICAMENTE REACTIVAS DE COMPONENTES DE FIBRILAS AMILÓIDES E EM PARTICULAR PÉPTIDOS OU PROTEÍNAS QUE FORMEM FIBRILAS. A INVENÇÃO TAMBÉM DIZ RESPEITO A COMPOSIÇÕES TERAPÊUTICAS E A MÉTODOS NOS QUAIS SE UTILIZAM REAGENTES IMUNES QUE REAGEM COM TAIS COMPONENTES FIBRILARES.

RESUMO**"PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE DOENÇAS AMILOIDOGÉNICAS"**

A presente invenção diz respeito a composições farmacêuticas e a métodos para a prevenção e para o tratamento de diversas doenças amilóides, incluindo a doença de Alzheimer, doenças do prião, neuropatias amilóides familiares e semelhantes. As composições farmacêuticas compreendem quantidades imunologicamente reactivas de componentes de fibrilas amilóides e em particular péptidos ou proteínas que formem fibrilas. A invenção também diz respeito a composições terapêuticas e a métodos nos quais se utilizam reagentes imunes que reagem com tais componentes fibrilares.

DESCRIÇÃO

"PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE DOENÇAS AMILOIDOGÉNICAS"

Campo da invenção

A invenção diz respeito a composições e a métodos para o tratamento de patologias relacionadas com a amilóide em seres humanos e em outros mamíferos vertebrados.

Antecedentes da invenção

O termo amiloidose é um termo genérico que descreve diversas doenças caracterizadas pelo depósito extracelular de fibrilas proteicas, as quais formam diversos "depósitos amilóides", os quais podem ocorrer em locais definidos ou sistemicamente. A composição fibrilar destes depósitos constitui uma característica identificadora de diversas formas da doença amilóide. Por exemplo, os depósitos intracerebrais e cerebrovasculares constituídos principalmente por fibrilas de péptidos β -amilóides (β -AP) são característicos da doença de Alzheimer (quer na forma familiar quer esporádica), os peptídicos amilóides dos ilhéus (IAPP; amilina) são característicos de fibrilas em depósitos amilóides de ilhéus de células pancreáticas associadas à diabetes de tipo II e a β 2-microglobulina é um componente principal dos depósitos amilóides que se formam como consequência do tratamento de hemodiálise a longo termo. Mais recentemente, doenças associadas ao prião, tais como a doença de Creutzfeld-Jacob, também foram reconhecidas como doenças amilóides.

As diversas formas da doença foram divididas em classes, com base principalmente no facto da amiloidose

estar ou não associada a uma doença sistémica subjacente. Assim, determinados distúrbios são considerados como amiloidose primária, nos quais não existem evidências para uma doença pré-existente ou co-existente. De um modo geral, a amiloidose primária da doença é caracterizada pela presença de fibrilas de proteínas do "tipo de cadeia leve amilóide" (tipo AL), assim designadas por homologia com a região do terminal N das fibrilas AL com o fragmento variável de cadeia leve de imunoglobulina (κ ou λ).

A amiloidose secundária ou "reactiva" é caracterizada pelo depósito de fibrilas de tipo AA obtidas a partir da proteína A amilóide (ApoSSA). Estas formas de amiloidose são caracterizadas por um estado de doença inflamatório ou infeccioso crónico subjacente (v.g., artrite reumatóide, osteomielite, tuberculose, lepra), caracterizadas por um estado de doença inflamatório ou infeccioso crónico subjacente (v.g., artrite reumatóide, osteomielite, tuberculose, lepra).

A amiloidose heredofamiliar pode apresentar depósitos neuropáticos, renais ou cardiovasculares associados do tipo transtiretina ATTR. Outras amiloidoses heredofamiliares incluem outras síndromes e podem possuir diferentes componentes amilóides (v.g., febre mediterrânea familiar, a qual é caracterizada por fibrilas AA). Outras formas de amiloidose incluem as formas locais, caracterizadas por depósitos localizados, muitas vezes do tipo tumor, que ocorrem em órgãos isolados. Outras amiloidoses estão associadas ao envelhecimento, e são normalmente caracterizadas pela formação de placas no coração ou no cérebro. Também são comuns depósitos amilóides associados a hemodiálise de longa duração. Estas e outras formas da doença amilóide

estão agrupadas no quadro 1. (Tan, S. Y. e Pepys, Histopathology 25: 403-414, 1994; Harrison's Handbook of Internal Medicine, 13ª Ed., Isselbacher, K. J., et al, eds, McGraw-Hill, San Francisco, 1995).

Quadro 1			
Classificação das doenças amilóides			
Proteína/ /péptido amilóide	Precursor de proteína	Variantes de proteína	Clínico
AA	Proteína A amilóide do soro (ApoSSA)		Amiloidose reactiva (secundária): febre mediterrânea familiar, neuropatia amilóide familiar com urticária e surdez (síndrome Muckle-Wells)
AA	Proteína A amilóide do soro (ApoSSA)		Amiloidose sistémica reactiva associada a doenças inflamatórias sistémicas
AL	Cadeias leves de imunoglobulina monoclonal (κ , λ)	A κ , A (v.g., A κ III)	Amiloidose idiopática (primária): associada a mieloma ou macroglobulinemia; amiloidose sistémica associada a discrasia de imunócitos; gamopatia monoclonal, discrasia oculta; amiloidose nodular local associada a doenças inflamatórias crónicas
AH	IgG (1(γ 1))	A γ 1	amiloidose de cadeia pesada associada a diversas discrasias de imunócitos
ATTR	Transtiretina (TTR)	pelo menos 30 mutações pontuais conhecidas	Polineuropatia amilóide familiar (v.g., Met 30, portuguesa)
ATTR	Transtiretina (TTR)	v.g., Met 111	Cardiomiopatia amilóide familiar (dinamarquesa)
ATTR	Transtiretina (TTR)	TTR ou Ile 122 de tipo selvagem	Amiloidose senil sistémica
AapoAl	ApoAl	Arg 26	Polineuropatia amilóide familiar

Quadro 1			
Classificação das doenças amilóides			
Proteína/ /péptido amilóide	Precursor de proteína	Variantes de proteína	Clínico
Agel	Gelsolina	Asn 187	Amiloidose familiar (finlandesa)
Acys	Cistatina C	Gln 68	Hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (islandesa)
A β	Precursor da proteína amilóide β (v.g., β -APP ₆₉₅)	Diversos: Gln 618	Doença de Alzheimer, síndrome de Down, Amiloidose hemorrágica cerebral hereditária (alemã), angiopatia amilóide cerebral esporádica, miosite corporal de inclusão
AB ₂ M	Microglobulina beta ₂		Associada a hemodiálise crónica
Acal	(Pro)calcitonina	(Pro)calcitonina	Carcinoma medular da tiróide
AANF	Factor natriurético auricular		Amiloidoses senis focais: amilóide auricular isolada
A β SVEP ^a AB ₂ M	Microglobulina beta ₂ do precursor de proteína β -amilóide		Vesículas seminais cerebrais Próstata
	queratina		Amilóide cutânea primária localizada (macular, papular)
PrP	Proteína precursora do prião (forma celular de 33-35 kDa)	Fragmento de proteína com 27-30 kDa	Doença de Creutzfeldt-Jacob esporádica, Kuru (encefalopatias espongiiformes transmissíveis, doenças do prião)
AlAPP	Ilhéus de polipéptido amilóide (IAPP)		Ilhéus de Langerhans, diabetes de tipo II, insulinoma
Fragmentos de hormonas de péptidos	v.g., precalcitonina		Amiloidose exócrina associada a APUDomas
^a Proteína exócrina de vesículas seminais			

Muitas vezes, as fibrilas que formam a maior parte de um depósito amilóide são derivadas de um ou vários proteínas ou péptidos precursores primários, e estão normalmente associadas a glicosaminoglicanos. Além disso, os depósitos amilóides podem incluir proteínas e péptidos menores de diversos tipos, em conjunto com outros componentes, tais como proteoglicanos, gangliósido e outros açúcares, tal como se descreve mais minuciosamente nas secções seguintes.

No presente momento, não existem tratamentos específicos dirigidos a amilóides para qualquer doença amilóide. No caso de existir uma doença subjacente ou associada, a terapêutica é dirigida à diminuição da produção de proteínas amiloidogénicas por meio do tratamento da doença subjacente. Tal é exemplificado pelo tratamento de tuberculose com antibióticos, o qual reduz a carga microbacteriana, dando origem à redução da inflamação e à redução associada da proteína SSA. No caso da amilóide AL provocada por mielomas múltiplos, a quimioterapia é administrada aos pacientes, provocando uma redução nas células de plasma e uma diminuição dos níveis de imunoglobulina no mieloma. À medida que estes níveis diminuem, é possível fazer desaparecer a amilóide AL. Nos pedidos de patente de invenção norte-americana nº USSN 09/201 430, depositado a 30 de Novembro de 1998, e nº USSN 09/322 289, depositado a 28 de Maio de 1999, cuja requerente é co-proprietária, encontra-se descrito que o peso da placa amilóide associado à doença de Alzheimer pode ser bastante reduzido (e prevenido) por meio da administração de agentes que produzam ou que confirmam uma resposta imune dirigida ao péptido β -amilóide ($A\beta$) e aos

seus fragmentos. De acordo com a presente invenção, concluiu-se que a indução de uma resposta imune contra os diversos componentes da placa amilóide constitui um tratamento eficaz para diversas doenças amilóides.

Descrição abreviada da invenção

A presente invenção diz respeito a composições farmacêuticas e a métodos para o tratamento de diversas doenças amilóides. De acordo com um aspecto, a invenção compreende uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1. De um modo geral, tais composições irão também incluir excipientes e adjuvantes. De acordo com variantes preferidas, como adjuvantes refere-se, por exemplo, hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio, MPL™, QS-21 (Stimulon™) ou adjuvante incompleto de Freund. De acordo com uma variante associada, tais composições farmacêuticas podem incluir diversos agentes que sejam eficazes para induzir uma resposta imune contra mais do que um componente amilóide num paciente.

O agente é eficaz na produção de uma resposta imune dirigida contra um componente amilóide de proteína ou péptido fibrilar. De preferência, um tal péptido ou proteína fibrilar é obtido a partir de um precursor proteico fibrilar, do qual se sabe que está associado com determinadas formas de doenças amilóides, conforme aqui descrito. Tais precursores proteicos incluem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, proteína A amilóide do soro (ApoSSA), cadeia leve da imunoglobulina, cadeia pesada da imunoglobulina, ApoA1, transtiretina, lisozima, fibrogénio de cadeia α , gelsolina, cistatina C, precursor proteico amilóide β (β -APP), microglobulina beta₂, proteína

precursora de prião, factor natriurético auricular, queratina, ilhéus de polipéptido amilóide, uma hormona peptídica e sinucleína. De acordo com uma variante preferida, o agente é eficaz para induzir uma resposta imune dirigida contra um neoepítipo formado por uma proteína ou péptido fibrilar, respeitante a um precursor proteico fibrilar. Isto é, conforme aqui descrito mais minuciosamente, muitos péptidos e proteínas formadoras de fibrilas são fragmentos de tais precursores proteicos, tais como os agrupados antes. No caso de tais fragmentos serem formados, tal como por clivagem proteolítica, podem ser revelados epítipos que não estavam presentes no precursor, não estando portanto imunologicamente disponíveis para o sistema imune quando o fragmento constitui uma parte do precursor proteico. Os agentes dirigidos a tais epítipos podem ser agentes terapêuticos preferidos, uma vez que é menos provável que induzam uma resposta auto-imune no paciente.

As composições farmacêuticas da invenção compreendem agentes dirigidos aos componentes amilóides seleccionados entre o conjunto constituído pelos seguintes péptidos ou proteínas de fibrila: cadeia λ AL, ATTR, AApoAl, Alys, Agel, AB₂M, Acal, AIAPP e fragmento NAC sinucleína. Os nomes completos e as composições destes péptidos são aqui descritos. Tais péptidos podem ser preparados de acordo com métodos bem conhecidos na especialidade, conforme aqui descrito.

De acordo com uma outra variante associada, os agentes incluídos em tais composições farmacêuticas também compreendem determinados proteoglicanos sulfatados. De acordo com uma variante associada, o proteoglicano é um

glicosaminoglicano de sulfato de heparina, de preferência perlecano, sulfato de dematano, condroitina-4-sulfato ou polissulfato de pentosano.

A presente invenção também diz respeito a um método para a prevenção ou para o tratamento de um distúrbio caracterizado pela deposição amilóide num sujeito mamífero. Administra-se ao sujeito uma dosagem de um agente eficaz para a produção de uma resposta imune contra um componente amilóide característico do distúrbio amilóide do qual padece o sujeito. Essencialmente, os métodos compreendem a administração de composições farmacêuticas que contêm componentes amilóides imunogénicos específicos do distúrbio, tais como os descritos antes. Esses métodos são ainda caracterizados pela sua eficácia para induzir respostas imunogénicas num sujeito. O método é eficaz para produzir uma resposta imunológica, a qual é caracterizada por um título no soro pelo menos de 1:1000 no que diz respeito ao componente amilóide contra o qual o agente imunogénico é dirigido, de preferência 1:5000 no que diz respeito ao componente fibrila. De acordo com uma variante associada, a resposta imune é caracterizada por uma quantidade no soro de imunorreatividade cerca de quatro vezes superior a um nível no soro de imunorreatividade, determinado numa amostra de soro de controlo pré-tratamento. Esta última caracterização é particularmente adequada no caso da imunorreatividade ser determinada por meio de técnicas de ELISA, mas também pode ser aplicada para qualquer determinação relativa ou absoluta da imunorreatividade no soro. De acordo com uma variante preferida, a imunorreatividade é determinada para uma diluição do soro de cerca de 1:100.

Ainda de acordo com outro aspecto associado, a invenção compreende um método para a determinação do prognóstico de um paciente que esteja a ser tratado para um distúrbio amilóide. Neste caso, a quantidade de imunorreactividade no soro do paciente contra um componente amilóide característico do distúrbio seleccionado é determinada, e uma quantidade de imunorreactividade no soro do paciente pelo menos quatro vezes superior um nível de controlo base de imunorreactividade no soro constitui um indicador para um prognóstico de uma melhoria do estado no que diz respeito ao distúrbio amilóide particular. De acordo com variantes preferidas, a quantidade de imunorreactividade contra o componente amilóide seleccionado que está presente no soro do paciente é caracterizada por um título no soro pelo menos de 1:1000, ou pelo menos de 1:5000, no que diz respeito ao componente amilóide.

Ainda de acordo com um aspecto associado, a invenção descreve ainda métodos designados por "imunização passiva" e composições farmacêuticas para a prevenção ou para o tratamento de doenças amilóides. De acordo com este aspecto, é administrado aos pacientes uma dosagem eficaz de um anticorpo que se liga especificamente a um componente amilóide seleccionado, de preferência um componente fibrila que esteja presente em depósitos amilóides característicos da doença que se pretende tratar. De um modo geral, tais anticorpos são seleccionados em função da sua aptidão para se ligar especificamente a diversas proteínas, péptidos e componentes, descritos nas composições farmacêuticas e métodos dos parágrafos anteriores desta secção. De acordo com uma variante associada, tais métodos e composições

podem compreender combinações de anticorpos que se ligam pelo menos a dois componentes fibrila amilóide. De um modo geral, as composições farmacêuticas são administradas para se proporcionar uma quantidade de imunorreactividade no soro contra o componente amilóide alvo, a qual é pelo menos quatro vezes superior do que um nível de imunorreactividade no soro contra o componente, determinado numa amostra de soro de controlo. Os anticorpos também podem ser administrados com um veículo, conforme aqui descrito. De um modo geral, de acordo com este aspecto da invenção, tais anticorpos serão administrados (ou formulados para administração) por via peritoneal, oral, intranasal, subcutânea, intramuscular, tópica ou intravenosa, mas podem ser administrados ou formulados para uma administração por qualquer via farmacêuticamente eficaz (isto é, eficaz para a produção dos níveis terapêuticos indicados, conforme aqui referido antes).

De acordo com variantes preferidas, os regimes de imunização descritos antes podem compreender a administração de agentes, incluindo anticorpos, em dosagens múltiplas, tais como ao longo de um período de 6 meses, tal como uma imunização inicial seguida de injeções de reforço em intervalos de tempo, tais como intervalos de 6 semanas, de acordo com métodos conhecidos na especialidade, ou de acordo com as necessidades do paciente, conforme determinado pela resposta imunológica. Em alternativa, ou suplementarmente, tais regimes podem compreender a utilização de formulações de "libertação prolongada", tais como são conhecidas na especialidade.

Estes e outros objectos e características da invenção irão ser mais evidentes após a leitura da seguinte

descrição minuciosa da invenção, em conjunto com os desenhos anexos.

Descrição abreviada das figuras

Fig. 1: título de anticorpos num murganho transgénico após injeção com A β 1-42.

Fig. 2: carga amilóide no hipocampo. A percentagem de área da região do hipocampo ocupada por placas amilóides, definida pela sua reactividade com o anticorpo 3D6 monoclonal específico de A β , foi determinada por meio de análise quantitativa de imagem assistida por computador de secções do cérebro imuno-reagidas. Os valores para os murganhos individuais são apresentados por grupo de tratamento. A linha horizontal para cada grupo indica o valor da mediana da distribuição.

Fig. 3: distrofia neurítica no hipocampo. A percentagem de área da região do hipocampo ocupada por neurites distróficas, definida pela sua reactividade com o anticorpo 8E5 monoclonal específico de APP humano, foi determinada por meio de análise quantitativa de imagem assistida por computador de secções do cérebro imuno-reagidas. Os valores para os murganhos individuais são apresentados para o grupo tratado com AN1792 e para o grupo de controlo tratado com PBS. A linha horizontal para cada grupo indica o valor da mediana da distribuição.

Fig. 4: astrocitose no córtex retroesplénico. A percentagem de área da região cortical ocupada por astrócitos positivos para proteína acídica fibrilar glial-astrócitos (GFAP) foi determinada por meio de análise quantitativa de imagem assistida por computador de secções do cérebro imuno-reagidas. Os valores para os murganhos

individuais são apresentados para o grupo de tratamento e os valores da mediana do grupo são indicados pela linha horizontal.

Fig. 5: média geométrica dos títulos de anticorpos para A β 42 após imunização com oito doses de A β 42 ("AN1792"), contendo 0,14, 0,4, 1,2, 3,7, 11, 33, 100 ou 300 μ g.

Fig. 6: cinética da resposta de anticorpos a imunização com AN1792. Os títulos são expressos como médias geométricas dos valores obtidos para os 6 animais de cada grupo.

Fig. 7: análise quantitativa da imagem da carga amilóide cortical em murganhos tratados com PBS e AN1792.

Fig. 8: análise quantitativa da imagem da carga de placas neuríticas em murganhos tratados com PBS e AN1792.

Fig. 9: análise quantitativa da imagem da percentagem do córtex retrosplenial ocupado por astrocitose em murganhos tratados com PBS e AN1792.

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

Fig. 11: níveis totais de A β no córtex cerebral. Um gráfico de dispersão dos perfis individuais de A β em murganhos imunizados com A β ou com derivados de APP combinados com adjuvante de Freund.

Fig. 12: carga amilóide no córtex, determinada por análise quantitativa de imagem de secções do cérebro imunoreagidas para murganhos imunizados com os conjugados do péptido A β , A β 1-5, A β -12 e A β 13-28; o A β de comprimento completo abrange A β 42 ("AN1792") e A β 1-40 ("AN1528") e o grupo de controlo tratado com PBS.

Fig. 13: média geométrica dos títulos do anticorpo específico de A β para grupos de murganhos imunizados com derivados de A β ou de APP combinados com adjuvante de Freund.

Fig. 14: média geométrica dos títulos do anticorpo específico de A β para grupos de cobaias imunizados com AN1792, ou com um seu derivado palmitoilado, combinado com diversos adjuvantes.

Fig. 15: níveis de A β no córtex de murganhos PDAPP com 12 meses de idade tratados com AN1792 ou AN1528 com diversos adjuvantes.

Fig. 16: título médio de murganhos tratados com anticorpo policlonal para A β .

Fig. 17: título médio de murganhos tratados com anticorpo monoclonal 10D5 para A β .

Fig. 18: título médio de murganhos tratados com anticorpo monoclonal 2F12 para A β .

Descrição minuciosa da invenção

A. Definições

Salvo quando indicado de outro modo, todos os termos aqui utilizados na presente invenção possuem as significações habituais do conhecimento dos especialistas na matéria. Em particular refere-se a obra de Sambrook, *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Second Edition), Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y. e de Ausubel, F. M., *et al.* (1998) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, NY, para as definições, termos da especialidade e métodos convencionais conhecidos nas especialidades de bioquímica e de biologia

molecular. Faz-se observar que a presente invenção não está limitada pelos métodos, protocolos e reagentes particulares descritos, uma vez que estes podem ser alterados para se obter o mesmo resultado.

O termo "adjuvante" designa um composto que no caso de ser administrado em conjunto com um antigénio, aumente a resposta imune ao antigénio, mas que no caso de ser administrado por si só não crie uma resposta imune ao antigénio. Os adjuvantes podem aumentar uma resposta imune por diversos mecanismos, incluindo o recrutamento de linfócitos, a estimulação de células B e/ou T e a estimulação de macrófagos.

O termo "doença amilóide" ou "amiloidose" designa qualquer um dos diversos distúrbios que compreendem como sintoma ou como parte da sua patologia a acumulação ou a formação de placas amilóides.

A expressão "placa amilóide" designa um depósito extracelular constituído principalmente por fibrilas proteínáceas. De um modo geral, as fibrilas são constituídas por uma proteína ou um péptido dominante; no entanto, a placa também podem compreender componentes suplementares, tais como moléculas peptídicas ou não peptídicas, conforme aqui descrito.

A expressão "componente amilóide" designa qualquer entidade molecular que esteja presente numa placa amilóide, incluindo as porções antigénicas de tais moléculas. Os componentes amilóides compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, proteínas, péptidos, proteoglicanos e hidratos de carbono. A expressão "componente amilóide específico" designa uma entidade

molecular que é encontrada principalmente ou exclusivamente na placa amilóide relevante.

O termo "agente" designa uma molécula química de origem sintética ou biológica. No contexto da presente invenção, um agente é normalmente uma molécula que pode ser utilizada numa composição farmacêutica.

A expressão "agente anti-amilóide" designa um agente que é capaz de produzir uma resposta imune contra um componente da placa amilóide num sujeito vertebrado, quando administrado por meio de técnicas de imunização activas ou passivas.

Os termos "polinucleótido" e "ácido nucleico", tal como aqui utilizados interpermutavelmente, designam uma molécula polimérica que possui uma estrutura que suporta bases que sejam capazes de efectuar pontes de hidrogénio a polinucleótidos típicos, em que a estrutura do polímero apresenta as bases de um modo tal que permite tal ponte de hidrogénio numa sequência específica entre a molécula polimérica e um polinucleótido típico (v.g., ADN de cadeia simples). Tipicamente, tais bases são inosina, adenosina, guanosina, citosina, uracilo e timidina. As moléculas poliméricas incluem ADN e ARN de cadeia simples e dupla, e as suas modificações estruturais, por exemplo, ligações metilfosfonato.

O termo "polipéptido", tal como aqui utilizado, designa um composto obtido a partir de uma cadeia simples de resíduos de aminoácido ligados por ligações peptídicas. O termo "proteína" pode ser sinónimo do termo "polipéptido" ou pode designar um complexo de dois ou mais polipéptidos.

O termo "péptido" também designa um composto constituído por resíduos de aminoácido ligados por ligações

peptídicas. De um modo geral, os péptidos são constituídos por 100 ou menos aminoácidos, ao passo que os polipéptidos ou as proteínas possuem mais de 100 aminoácidos. Tal como aqui utilizado, o termo "fragmento proteico" também pode ser interpretado como um péptido.

A expressão "péptido fibrilar" ou "proteína fibrilar" designa uma forma monomérica ou agregada de uma proteína ou de um péptido que forma as fibrilas presentes nas placas amilóides. São aqui proporcionados exemplos de tais péptidos e proteínas.

A expressão "composição farmacêutica" designa uma composição química ou biológica adequada para administração a um indivíduo mamífero. Tais composições podem ser especificamente formuladas para administração por meio de uma ou de diversas vias, incluindo, mas sem que isso constitua qualquer limitação, as vias oral, parentérica, intravenosa, intra-arterial, subcutânea, intranasal, sublingual, intraespinal, intracerebroventricular e semelhantes.

A expressão "excipiente farmacêutico" ou "excipiente farmacêuticamente aceitável" designa um veículo, normalmente um líquido, no qual o agente terapêutico activo é formulado. De um modo geral, o excipiente não proporciona qualquer actividade farmacológica à formulação, embora possa proporcionar estabilidade química e/ou biológica, características de libertação e semelhantes. É possível encontrar formulações exemplificativas, por exemplo, na obra Remington's Pharmaceutical Sciences, 19^a Ed., Grennaro, A., Ed., 1995.

O termo "glicoproteína" designa uma proteína à qual se encontra covalentemente ligada pelo menos uma cadeia de hidrato de carbono (oligopolissacárido).

O termo "proteoglicano" designa uma glicoproteína em que pelo menos uma das cadeias de hidrato de carbono é um glicosaminoglicano, o qual é um polímero linear comprido de dissacáridos repetidos, em que um membro do par é normalmente um ácido de açúcar (ácido urónico) e o outro é um açúcar amino.

O termo resposta "imunológica" ou "imune" ou "imunogénica" designa o desenvolvimento de uma resposta humoral (mediada por anticorpos) e/ou celular (mediada por células T específicas do antigénio ou os seus produtos de secreção) dirigida contra um antigénio num indivíduo vertebrado. Tal resposta pode ser uma resposta activa induzida pela administração de imunogénios ou uma resposta passiva induzida pela administração de anticorpos ou de células T desencadeadas. Uma resposta imune celular é ilustrada pela apresentação de epítomos polipeptídicos associados a moléculas de MHC de classe I ou de classe II para activar células T auxiliares CD4⁺ específicas do antigénio e/ou células T citotóxicas CD8⁺. A resposta também pode implicar a activação de monócitos, macrófagos, células NK, basófilos, células dendríticas, astrócitos, células microgliais, eosinófilos ou outros componentes de imunidade natural. A presença de uma resposta imunológica mediada por células pode ser determinada por meio de ensaios de proliferação convencionais (células T CD4⁺) ou por ensaios CTL (linfócito T citotóxico) conhecidos na especialidade. As contribuições relativas das respostas humoral e celular para o efeito protector ou terapêutico de

um imunogénio podem ser distinguidas por meio do isolamento em separado de fracções de imunoglobulina (IgG) e de células T a partir de um animal singénico imunizado e determinação do efeito protector ou terapêutico num segundo sujeito.

A expressão "agente imunogénico" ou "imunogénio" ou "antigénio" designa uma molécula que é capaz de induzir uma resposta imunológica contra ela própria após a administração a um paciente, quer em conjunto com um adjuvante quer na ausência deste. Como exemplos de tais moléculas refere-se péptidos de fibrila amilóide, ou seus fragmentos, conjugados com um veículo proteico, tal como hemocianina de *diodora apertura*, Cd3 ou toxina do tétano.

O termo "epítipo" ou determinante antigénico" designa uma parte de um antigénio que se liga à região de ligação do antigénio de um anticorpo.

Os termos "A β ", "péptido A β " e péptido "amilóide β " são sinónimos e designam um ou várias composições de péptidos com cerca de 38 a 43 aminoácidos, obtidas a partir de proteína precursora de amilóide β (β -APP), conforme aqui descrito. O termo "A β xx" designa um péptido amilóide β 1-xx, em que xx representa um número que indica o número de aminoácidos no péptido; v.g., A β 42 é idêntico a A β 1/42, o qual também é aqui designado por "AN1792" e o termo A β 40 é idêntico a A β 1-40, o qual é aqui designado por "AN1578".

A expressão A β desagregado ou monomérico designa unidades peptídicas monoméricas solúveis e A β . Um método para a preparação de A β consiste na dissolução de um péptido liofilizado em DMSO puro com ultra-sons. A solução resultante é centrifugada para se remover quaisquer particulados insolúveis. O A β agregado é uma mistura de

oligómeros, na qual as unidades monoméricas são mantidas em conjunto por ligações não covalentes.

A expressão "polinucleótido desguarnecido" designa um polinucleótido que não foi complexado com materiais coloidais. Os polinucleótidos desguarnecidos são por vezes clonados num vector plasmídeo.

O termo "paciente" compreende seres humanos e outros mamíferos que são submetidos a um tratamento profiláctico ou terapêuticos.

As expressões "significativamente diferente de", "estatisticamente significativa", "significativamente superior (ou inferior) a" e frases semelhantes designam comparações entre dados ou outras medições, em que as diferenças entre os dois indivíduos ou grupos comparados são evidente ou razoavelmente diferentes para um observador treinado ou então são estatisticamente significativas (se a frase incluir o termo "estatisticamente" ou no caso de existir alguma indicação de um teste estatístico, tal como valor p , ou no caso de os dados, quando analisados, produzirem uma diferença estatística em testes estatísticos convencionais conhecidos na especialidade).

As composições ou métodos que "compreendem" um ou mais elementos referidos podem incluir outros elementos que não foram especificamente referidos. Por exemplo, uma composição que compreende um componente peptídico de fibrila abrange o péptido isolado e o péptido como componente de uma sequência de polipéptido mais comprida. Num outro exemplo, uma composição que compreenda os elementos A e B também compreende uma composição constituída por A, B e C.

B. Doenças amilóides

1. Visão geral e patogênese

As doenças amilóides ou amiloidoses compreendem diversas doenças que apresentam vários sintomas aparentes. Estes distúrbios apresentam em comum a presença de depósitos extracelulares anormais de fibrilas de proteínas, designados por “depósitos amilóides” ou “placas amilóides”, que possuem normalmente um diâmetro de cerca de 10-100 μm e que estão localizadas em órgãos ou em regiões de tecidos específicos. Tais placas são constituídas principalmente por proteínas ou péptidos solúveis que ocorrem naturalmente. De um modo geral, estes depósitos insolúveis são constituídos por agregados laterais de fibrilas que possuem um diâmetro aproximado de 10 a 15 nm. As fibrilas amilóides produzem uma birrefringência verde maçã característica em luz polarizada, quando manchadas com o corante vermelho do Congo. Os distúrbios são classificados com base nos componentes fibrila principais que formam os depósitos de placas, conforme a seguir se descreve.

Os péptidos ou as proteínas que formam os depósitos de placas são muitas vezes produzidos a partir de uma proteína precursora mais comprida. Mais especificamente, a patogênese dos depósitos de fibrila amilóide implicam geralmente a clivagem proteolítica de uma proteína precursora “anormal” em fragmentos. De um modo geral, estes fragmentos agregam-se em folhas franzidas anti-paralelas β ; no entanto, foram já descritas formas não agregadas de proteínas precursoras que agregam e formam fibrilas em polineuropatias amilóides familiares (variantes de fibrilas

de transtiretina) e em amiloidoses associadas a diálise (fibrilas e microglobulina β_2) (Tan, et al., 1994, *supra*).

2. Síndromes clínicas

Esta secção proporciona descrições para os tipos principais de amiloidoses, incluindo as suas composições de placas de fibrila características. De acordo com a presente invenção, concluiu-se que as doenças amilóides podem ser tratadas por meio da administração de agentes que servem para a estimulação de uma resposta imune contra um componente ou componentes dos diversos depósitos amilóides específicos das doenças. Tal como descrito mais minuciosamente na secção C *infra*, tais componentes são preferencialmente constituintes das fibrilas que formam as placas. As secções seguintes servem para exemplificar as formas principais de amiloidoses.

a. Amiloidose AA (reactiva)

De um modo geral, as fibrilas AMINOÁCIDO são constituídas por fragmentos com 8000 dalton (péptido ou proteína AMINOÁCIDO) formados pela clivagem proteolítica da proteína amilóide A do soro (apoSSA), que é uma apolipoproteína de circulação que está presente em partículas de HDL, a qual é sintetizada nos hepatócitos em resposta a citocinas, tais como IL-1, Il-6 e TNF. A deposição pode ser espalhada pelo corpo, sendo preferencialmente em órgãos parenquimais. O baço constitui normalmente um local de deposição, também sendo possível afectar o fígado. A deposição também é habitual no coração e no tracto gastrointestinal.

As doenças amilóides AA incluem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, doenças inflamatórias, tais como artrite reumatóide, artrite juvenil crónica, espondilite anquilosante, psoríase, artropatia psoriática, síndrome de Reiter, doença de Still do adulto, síndrome de Behçet e doença de Crohn. Os depósitos de AA também são produzidos como resultado de infecções microbianas crónicas, tais como lepra, tuberculose, bronquiectasia, úlceras decúbita, pielonefrite crónica, osteomielite e doença de Whipple. Há determinados neoplasmas malignos que podem dar origem a depósitos amilóides de fibrila AA. Estes compreendem patologias, tais como linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas do intestino, do pulmão e do tracto uretogenital, carcinoma das células basais e leucemia de células pilosas.

b. Amiloidoses AL

De um modo geral, a deposição amilóide AL está associada praticamente com todas as discrasias da linhagem de linfócitos B, desde malignidade de células do plasma (mieloma múltiplo) até gamopatia monoclonal benigna. Por vezes, a presença de depósitos amilóides pode constituir um indicador primário de discrasia subjacente.

As fibrilas de depósitos amilóides AL são constituídas por cadeias leves de imunoglobulina monoclonal, ou seus fragmentos. Mais especificamente, os fragmentos são obtidos a partir da região do terminal N da cadeia leve (κ ou λ) e contêm a totalidade ou parte do seu domínio variável (V_L). De um modo geral, os depósitos ocorrem em tecidos mesenquimais, provocando neuropatia periférica e autonómica, síndrome do túnel cárpico, macroglossia,

cardiomiopatia restrictiva, artropatia das articulações largas, discrasias imunes, mielomas, bem como discrasias ocultas. No entanto, faz-se observar que podem estar implicados praticamente todos os tecidos, em particular órgãos viscerais, tais como o coração.

c. Amiloidoses sistémicas hereditárias

Há muitas formas de amiloidoses sistémicas hereditárias. Embora sejam patologias relativamente raras, o início dos sintomas em adultos e os seus padrões de hereditariedade (normalmente dominantes autossómicas) provocam uma persistência de tais distúrbios na população geral. De um modo geral, as síndromes são atribuíveis a mutações pontuais na proteína precursora que provoca a produção de variantes de péptidos ou proteínas amiloidogénicas. No quadro 2 encontra-se agrupada a composição de fibrila de formas exemplificativas destes distúrbios.

Quadro 2

Amiloidoses hereditárias ^a		
Péptido/Proteína de fibrila	Variante genética	Síndrome clínica
Transtiretina e fragmentos (ATTR)	Met30 e muitas outras	Polineuropatia amilóide familiar (FAP), (principalmente nervos periféricos)
Transtiretina e fragmentos (ATTR)	Thr45, Ala60, Ser84, Met111, Ile122	Envolvimento cardíaco predominante na ausência de neuropatia
Fragmento N-terminal de apolipoproteína A1 (apoAI)	Arg26	Polineuropatia amilóide familiar (FAP), (principalmente nervos periféricos)

Amiloidoses hereditárias ^a		
Péptido/Proteína de fibrila	Variante genética	Síndrome clínica
Fragmento N-terminal de apolipoproteína A1 (apoA1)	Arg26, Arg50, Arg60, outros	Tipo Ostertag, não neuropática (envolvimento visceral predominante)
Lisozima (Alys)	Thr56, His67	Tipo Ostertag, não neuropática (envolvimento visceral predominante)
Fragmento de cadeia α de fibrogénio	Leu554, Val526	Tipo Ostertag, não neuropática (envolvimento visceral predominante)
Fragmento gelsolina (Agel)	Asn187, Tyr187	Neuropatia craniana com distrofia reticulada da córnea
Fragmento de cistatina C	Glu68	Hemorragia cerebral hereditária (angiopatia amilóide cerebral) - tipo islandês
Proteína β -amilóide (A β) obtida a partir da proteína precursora amilóide (APP)	Gln693	Hemorragia cerebral hereditária (angiopatia amilóide cerebral) - tipo alemão
Proteína β -amilóide (A β) obtida a partir da proteína precursora amilóide (APP)	Ile717, Phe717, Gly717	Doença de Alzheimer familiar
Proteína β -amilóide (A β) obtida a partir da proteína precursora amilóide (APP)	Asn670, Leu671	Demência familiar - provável doença de Alzheimer
Proteína do prião (PrP) obtida a partir da proteína precursora PrP, com inserção 51-91	Leu102, Val167, Asn178, Lys200	Doença de Creutzfeldt familiar; síndrome Gerstmann-Sträussler-Scheinker (encefalopatias espongiiformes hereditárias, doenças do prião)
AA obtida a partir da proteína amilóide A do soro (ApoSSA)		Febre do mediterrânea familiar, envolvimento renal predominante (autossómico recessivo)

Amiloidoses hereditárias ^a		
Péptido/Proteína de fibrila	Variante genética	Síndrome clínica
AA obtida a partir da proteína amilóide A do soro (ApoSSA)		Síndrome de Muckle-Well, nefropatia, surdez, urticária, dor lombar
Desconhecido		Cardiomiopatia com paragem auricular persistente
Desconhecido		Depósitos cutâneos (bulosos, papulares, pustulodérmicos)
^a Dados obtidos a partir de Tan & Pepys, 1994, <i>supra</i> .		

Os dados apresentados no quadro 2 são exemplificativos e não pretendem limitar o âmbito da invenção. Por exemplo, foram já descritas 40 mutações pontuais em separado para o gene da transtiretina, todas as quais dão origem a formas semelhantes de polineuropatia amilóide familiar.

A transtiretina (TTR) é uma proteína com 14 quilodaltons que é por vezes designada como prealbumina. É produzida pelo fígado e pelo plexo coróide e tem como função o transporte de hormonas da tiróide e de vitamina A. Pelo menos 50 variantes da proteína, todas elas caracterizadas por alteração de um único aminoácido, são responsáveis pelas diversas formas de polineuropatia amilóide familiar. Por exemplo, a substituição de prolina por leucina na posição 55 dá origem uma forma particularmente progressiva de neuropatia; a substituição de metionina por leucina na posição 111 dá origem a uma cardiopatia grave em pacientes dinamarqueses. Os depósitos amilóides isolados de tecido do coração de pacientes com amiloidose sistémica revelaram que os depósitos são constituídos por uma mistura heterogénea de TTR e de seus fragmentos, designados colectivamente por ATTR, cujas

sequências de comprimento completo foram já caracterizadas. Os componentes de fibrila de ATTR podem ser extraídos a partir de tais placas e é possível determinar a sua estrutura e sequência de acordo com métodos conhecidos na especialidade (v.g., Gustavsson, A., et al., *Laboratory Invest.* 73: 703-708, 1995; Kametani, F., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125: 622-628, 1984; Pras, M., et al., *PNAS* 80: 53942, 1983).

Pessoas com mutações pontuais na molécula de apolipoproteína AI (v.g., Gly → Arg26; Trp → Arg50; Leu → Arg60) exibem uma forma de amiloidose (“de tipo Östertag”), que é caracterizada por depósitos da proteína apolipoproteína AI ou seus fragmentos (AApoAI). Estes pacientes possuem níveis reduzidos de lipoproteína de elevada densidade (HDL) e apresentam uma neuropatia periférica ou uma insuficiência renal.

Uma mutação na cadeia α da enzima lisozima (v.g., Ile → Thr56 ou Asp → His57) constitui a base de outra forma de amilóide hereditária não neuropática de tipo Östertag que foi exibida por famílias inglesas. Neste caso, as fibrilas da proteína lisozima mutante (Alys) são depositadas e os pacientes exibem normalmente uma função renal deficiente. Esta proteína, ao contrário da maior parte das proteínas formadoras de fibrila aqui descritas, está normalmente presente numa forma completa (não fragmentada) (Benson, M. D., et al. *CIBA Fdn. Symp.* 199: 104-131, 1996).

O péptido β -amilóide (A β) é um péptido com 39 a 43 aminoácidos obtido por proteólise de uma proteína comprida, conhecida como proteína precursora β -amilóide (β APP). As mutações na β APP dão origem a forma familiares da doença de

Alzheimer, da síndrome de Down e/ou de demência senil, caracterizadas pela deposição cerebral de placas constituídas por fibrilas de A β e outros componentes, os quais são a seguir descritos mais minuciosamente. Mutações conhecidas na APP associadas à doença de Alzheimer ocorrem junto aos locais de clivagem de secretase β ou γ ou dentro de A β . Por exemplo, a posição 717 está junto ao local de clivagem de secretase γ de APP no seu processamento para A β e as posições 670/671 estão junto ao local de clivagem de secretase β . As mutações de qualquer destes resíduos podem resultar na doença de Alzheimer, presumivelmente devido a um aumento da forma de 42/43 aminoácidos de A β gerada a partir de APP. A estrutura e a sequência de péptidos A β de vários comprimentos são bem conhecidas na especialidade. Tais péptidos podem ser preparados por métodos conhecidos na especialidade (v.g., Glenner e Wong, *Biochem Biophys. Res. Comm.* 129: 885-890, 1984; Glenner e Wong, *Biochem Biophys. Res. Comm.* 122: 1131-1135, 1984). Além disso, há diversas formas dos péptidos que se encontram comercialmente disponíveis.

A sinucleína é uma proteína associada a sinapse que se assemelha a uma apoliproteína e existe em abundância nos terminais citossólicos neuronais e pré-sinápticos. Um fragmento peptídico obtido a partir de sinucleína α , designado por NAC, também é um componente das placas amilóides da doença de Alzheimer. (Clayton, et al., 1998). Este componente também serve como alvo para tratamentos com base imunológica da presente invenção, conforme descrito minuciosamente *infra*.

A gelsolina é uma proteína de ligação ao cálcio que se liga a fragmentos de filamentos de actina. As mutações na

posição 187 (v.g., Asp → Asn; Asp → Tyr) da proteína dão origem a uma forma de amiloidose sistêmica hereditária, normalmente encontrada em pacientes da Finlândia, bem como em pessoas da Alemanha ou do Japão. Em indivíduos que padecem desta doença, as fibrilas formadas a partir de fragmentos de gelsolina (Agel), são normalmente constituídas por 173 a 243 aminoácidos (fragmento do terminal carboxi de 68 kDa) e são depositadas em vasos sanguíneos e em membranas basais, dando origem a distrofia da córnea e a neuropatia craniana que progride para neuropatia periférica, alterações distróficas na pele e deposição em outros órgãos. (Kangas, H., et al. *Human Mol. Genet.* 5 (9): 1237-1243, 1996).

Outras proteínas mutadas, tais como a cadeia α mutante de fibrogénio (AfibA) e a cistatina C mutante (Acys) também formam fibrilas e produzem distúrbios hereditários característicos. As fibrilas de AfibA formam depósitos característicos de um amilóide hereditário não neuropático com doença renal; os depósitos de Acys são característicos de uma angiopatia amilóide cerebral hereditária encontrada na Islândia. (Isselbacher, et al., *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill, San Francisco, 1995; Benson, et al., *supra.*). Pelo menos em alguns casos, os pacientes com angiopatia amilóide cerebral (CAA) têm demonstrado possuir fibrilas amilóides que contêm uma forma não mutante de cistatina C em conjunto com a proteína β . (Nagai, A., et al. *Molec. Chem. Neuropathol.* 33: 63-78, 1998).

Determinadas forma da doença do prião são agora consideradas como sendo hereditárias, totalizando até 15% dos casos, as quais se pensava inicialmente que possuíam

uma natureza predominantemente infecciosa. (Baldwin, *et al.*, em *Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders*, John Wiley and Sons, New York, 1995). Em tais distúrbios do prião, os pacientes desenvolvem placas constituídas por isoformas anormais da proteína do prião normal (PrP^C). Uma isoforma mutante predominante, PrP^{Sc}, também designada por AScr, difere da proteína celular normal na sua resistência à degradação de protease, na insolubilidade após extracção com detergente, na deposição em lisossomas secundários, na síntese pós-tradução e no conteúdo de folhas franzidas β . Foi já estabelecida a ligação genética pelo menos para cinco mutações que dão origem à doença de Creutzfeldt-Jacob (CJD), síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) e a insónia familiar fatal (FFI). (Baldwin) Os métodos para a extracção de péptidos de fibrila a partir de fragmentos de fibrilas, a determinação de sequências e a preparação de tais péptidos são conhecidas na especialidade (*v.g.*, M., *et al*, *J. Gen. Virol.* 76: 2567-76, 1995).

Por exemplo, uma forma de GSS foi associada a uma mutação de PrP no codão 102, ao passo que a GSS telencefálica é segregada com uma mutação no codão 117. As mutações nos codões 198 e 217 dão origem a uma forma de GSS em que as placas neuríticas características da doença de Alzheimer contêm PrP em vez do péptido A β . Foram já associadas determinadas formas de CJD familiar a mutações nos codões 200 e 210; foram encontradas mutações nos codões 129 e 178 em CJD e FFI familiar. (Baldwin, *supra*).

d. Amiloidose sistémica senil

A deposição amilóide, quer sistémica quer local, aumenta com a idade. Por exemplo, as fibrilas de transtiretina (TTR) de tipo selvagem são normalmente encontradas no tecido do coração de indivíduos idosos. Estas podem ser assintomáticas, clinicamente silenciosas ou podem provocar uma paragem cardíaca. Os depósitos locais fibrilares assintomáticos também podem ocorrer no cérebro (A β), nos corpos amiláceos da próstata (microglobulina A β_2), nas articulações e nas vesículas seminais.

e. Amiloidose cerebral

A deposição local de amilóide é frequente no cérebro, em particular em indivíduos idosos. O tipo mais frequente de amilóide no cérebro é constituído principalmente por fibrilas do péptido A β , dando origem a demência ou a doença de Alzheimer esporádica (não hereditária). De facto, a incidência da doença de Alzheimer esporádica excede bastante as formas hereditárias. As fibrilas de péptidos que forma estas placas são bastante semelhantes às descritas antes, no que diz respeito às formas hereditárias da doença de Alzheimer (DA).

f. Amiloidose associada a diálise

As placas constituídas por microglobulina β_2 (A β_2 M) desenvolvem-se normalmente em pacientes que são submetidos a hemodiálise ou diálise peritoneal durante períodos longos. A microglobulina β_2 é um polipéptido com 11,8 kDa e é a cadeia leve de antigénios MHC de classe I, os quais estão presentes em todas as células do núcleo. Em circunstâncias normais, é continuamente vertida a partir das membranas celulares e é normalmente filtrada pelo rim.

A deficiência na limpeza, tal como no saco da função renal deficiente, provoca a deposição no riam e em outros locais (principalmente em tecidos ricos em colagénio das articulações). Ao contrário de outras fibrilas de proteínas, as moléculas de A β ₂M estão normalmente presentes numa forma não fragmentada nas fibrilas. (Benson, *supra*).

g. Amiloidose derivadas de hormonas

Os órgãos endócrinos podem ancorar depósitos amilóides, em particular em indivíduos idosos. Os tumores que segregam hormonas também podem conter placas amilóides derivadas de hormonas, cujas fibrilas são produzidas por hormonas polipeptídicas, tais como calcitonina (carcinoma medular da tiróide), ilhéus de polipéptidos amilóides (amilina; que ocorrem na maior parte dos pacientes com diabetes de tipo II) e péptidos natriuréticos auriculares (amiloidose auricular isolada). As sequências e as estruturas destas proteínas são bem conhecidas na especialidade.

h. Amiloidoses diversas

Existem diversas outras formas da doença amilóide que são normalmente manifestadas como depósitos amilóides localizados. De um modo geral, estas doenças são provavelmente o resultado da produção localizada e/ou da ausência de catabolismo de precursores de fibrila específicos ou de uma pré-disposição para um tecido particular (tal como a articulação) para um depósito de fibrila. Como exemplos de tal deposição idiopática refere-se a amilóide AL nodular, amilóide cutânea, amilóide endócrina e amilóide associada a tumores.

C. Composições farmacêuticas

Constitui a descoberta da presente invenção que as composições capazes de provocar ou de proporcionar uma resposta imune dirigida a determinados componentes das placas amilóides são eficazes para o tratamento ou para a prevenção do desenvolvimento de doenças amilóides. Em particular, de acordo com a presente invenção, é possível prevenir a progressão, melhorar os sintomas e/ou reduzir a carga de placas amilóides em indivíduos afectados, no caso de se administrar a um paciente uma dose imuno-estimuladora de um agente anti-amilóide, ou de um correspondente reagente imune anti-amilóide. Esta secção descreve agentes anti-amilóides exemplificativos que produzem respostas imunes activas e também passivas contra placas amilóides e proporciona dados exemplificativos que demonstram a eficácia do tratamento utilizando tais composições sobre a carga de placas amilóides.

De um modo geral, os agentes anti-amilóides da invenção são constituídos por um componente específico da placa, de preferência um componente formador de fibrila, o qual é normalmente uma proteína, um péptido ou um seu fragmento característicos, conforme descrito na secção anterior e a seguir exemplificado. De um modo mais geral, os agentes terapêuticos utilizáveis na presente invenção produzem ou induzem uma resposta imune contra a placa ou, mais especificamente, contra um seu componente de fibrila. Assim sendo, tais agentes compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, o próprio componente e suas variantes, análogos e miméticos do componente que induzem e/ou interreagem com anticorpos do componente, bem como

anticorpos ou células T que são especificamente reactivas com o componente amilóide. De acordo com uma característica importante, as composições farmacêuticas não são seleccionadas a partir de componentes não específicos - isto é, entre os componentes que estão normalmente em circulação ou que estão ubíquos em todo o corpo. A título exemplificativo, a proteína amilóide do soro (SAP) é uma glicoproteína que circula no plasma que é produzida no fígado e que se liga à maioria das formas conhecidas de depósitos amilóides. De preferência, as composições terapêuticas são dirigidas a este componente.

A indução de uma resposta imune podem ser activa, no caso de se administrar um imunogénio para induzir anticorpos ou células T reactivos com o componente num paciente, ou passiva, no caso de se administrar um anticorpo que se liga ele próprio ao componente amilóide num paciente. Como agentes exemplificativos para a indução ou para a produção de uma resposta imune contra as placas amilóides refere-se os descritos nas secções seguintes.

As composições farmacêuticas da presente invenção compreendem, para além do(s) agente(s) imunogénico(s), uma quantidade eficaz de um adjuvante e/ou excipiente. Os adjuvantes e excipientes farmacêuticamente eficazes e úteis são bem conhecidos na especialidade, e encontram-se descritos mais minuciosamente nas secções seguintes.

1. Agentes imuno-estimuladores (resposta imune activa)

a. Composições anti-fibrilares

Uma classe geral de agentes anti-amilóides preferidos é constituída por agentes obtidos a partir de proteínas de

fibrila amilóide. Tal como referido antes, a característica principal das doenças amilóides é a deposição num órgão de placas amilóides constituídas principalmente por fibrilas, as quais, por sua vez, são constituídas por proteínas ou péptidos de fibrila característicos. De acordo com a presente invenção, um tal componente proteína ou péptido de fibrila constitui um agente útil para a indução de uma resposta imune anti-amilóide.

Os quadros 1 e 2 agrupam proteínas formadoras de fibrila exemplificativas que são características de diversas doenças amilóides. De acordo com este aspecto, a presente invenção proporciona a administração a um indivíduo afectado ou susceptível de uma composição imunoestimuladora que inclui a proteína ou o péptido de fibrila adequado, proporcionando o tratamento terapêutico ou profiláctico da doença amilóide.

A título exemplificativo, o A β , também conhecido como péptido β -amilóide, ou péptido A4 (veja-se a patente de invenção norte-americana n $^{\circ}$ 4 666 829; Glenner & Wong, Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 1131 (1984)), é um péptido com 39 a 43 aminoácidos, que é o componente principal de placas características da doença de Alzheimer. O A β é gerado por meio do processamento de uma proteína APP mais comprida através de duas enzimas, designadas por secretases β e γ (veja-se Hardy, TINS 20, 154 (1997)).

O exemplo 1 descreve os resultados de experiências efectuadas para comprovar a presente invenção, nas quais o péptido A β 42 foi administrado a murganhos transgénicos heterozigóticos que sobreexpressam a APP humana com uma mutação na posição 717. Estes murganhos, conhecidos como "murganhos PDAPP", exibem uma patologia do tipo Alzheimer e

são considerados um modelo animal para a doença de Alzheimer (Games, et al., Nature 373: 523-7, 1995). Conforme descrito minuciosamente no exemplo, estes murganhos exibem uma neuropatia de placas A β detectável nos seus cérebros a partir dos 6 meses de idade, em que a deposição das placas progride ao longo do tempo. Nas experiências aqui descritas, administrou-se A β 42 agregado (AN 1792) a murganhos. A maior parte dos murganhos tratados (7/9) não apresentava qualquer amilóide detectável nos seus cérebros aos 13 meses de idade, em contraste com os murganhos de controlo (injectados com soluto salino ou não tratados), os quais apresentavam uma carga amilóide significativa no cérebro a esta idade (Fig. 2). Estas diferenças foram ainda mais pronunciadas no hipocampo (Fig. 3). Os murganhos tratados também exibiram títulos de anticorpo no soro significativos contra A β (todos eles superiores a 1:1000, 8/9 superiores a 1/10000; fig. 1, quadro 3A). De um modo geral, os murganhos tratados com soluto salino exibiram níveis de anticorpos contra A β 4 a 5 vezes inferiores para uma diluição de 1:100, para todos os testes efectuados, pelo que se considerou que não apresentavam uma resposta significativa em relação do controlo (quadro 3B). Estes estudos demonstraram que a injeção com o péptido A β formador de fibrila específico proporciona uma protecção contra a deposição de placas amilóides A β .

A proteína amilóide do soro (SAP), é uma glicoproteína que circula no plasma que é produzida no fígado e que se liga de um modo dependente do cálcio a todas as formas de fibrila amilóide, incluindo fibrilas de placas amilóides cerebrais na doença de Alzheimer. Como parte das

experiências subsequentes, injectou-se um grupo de murganhos com SAP; estes murganhos apresentaram títulos no soro significativos contra SAP (1:1000-1:30000), mas não apresentaram títulos no soro detectáveis contra o péptido A β e verificou-se o desenvolvimento de neuropatologia de placas cerebrais (fig. 2).

Outras experiências, descritas minuciosamente no exemplo II, demonstraram a dependência da dose do efeito imunogénico das injeções de A β em murganhos tratados entre as 5 semanas e os 8 meses de idade. Nestes murganhos, os títulos médios no soro de anticorpos peptídicos anti-A β aumentaram com o número de imunizações e com o aumento das dosagens; no entanto, após quatro imunizações, os títulos no soro medidos cinco dias após a imunização nivelaram para as doses superiores (1-300 μ g) em níveis de cerca de 1:10000 (Fig. 5).

No exemplo III são descritas experiências suplementares para comprovar a presente invenção, nas quais murganhos modelo PDAPP foram tratados com A β 42 com início num determinado instante (cerca de 11 meses de idade) após as placas amilóides já estarem presentes nos seus cérebros. Nestes estudos, os animais foram imunizados com A β 42 ou com soluto salino e foram sacrificados para se testar a carga amilóide com 15 ou 18 meses de idade. Conforme ilustrado na fig. 7, as 18 meses de idade, os murganhos tratados com A β 42 exibiam uma média significativamente inferior de carga de placa amilóide (carga de placa, 0,01%) do que os controlos tratados com PBS com 18 meses de idade (carga de placa, 4,7%) ou do que os animais não tratados com 12 meses (0,28%), em que a carga de placa foi determinada por análise de imagem, conforme descrito na parte 8 do exemplo

XIII. Estas experiências demonstraram a eficácia dos métodos de tratamento para a redução da carga de placa existente e para a prevenção da progressão da carga de placa em indivíduos doentes.

De acordo com este aspecto da invenção, os agentes terapêuticos são obtidos a partir de péptidos ou de proteínas de fibrila que compreendem as placas características da doença relevante. Em alternativa, tais agentes são suficientemente semelhantes do ponto de vista antigénico com tais componentes, de modo a induzir uma resposta imune que também inter-reaja com o componente fibrila. Os quadros 1 e 2 proporcionam exemplos de tais péptidos ou proteínas fibrilares, cujas composições e sequências são conhecidas na especialidade ou podem ser facilmente determinadas em conformidade com métodos conhecidos na especialidade. (Ver as referências citadas *infra* e a secção B2 para referências que apresentam métodos específicos para extracção e/ou composições de diversos componentes peptídicos fibrilares; a seguir são descritos outros componentes de fibrila exemplificativos).

Quando é efectuado um diagnóstico de uma doença amilóide, com base em determinações clínicas e/ou biópsia, um especialista na matéria irá ser capaz de determinar a composição de fibrila dos depósitos amilóides e proporciona um agente que induza uma resposta imune dirigida aos péptidos ou proteínas fibrilares.

A título exemplificativo, tal como descrito antes, o agente terapêutico utilizado para o tratamento da doença de Alzheimer ou de outras doenças amilóides caracterizadas pela deposição de fibrila A β pode ser qualquer uma das formas que ocorrem naturalmente do péptido A β e, em

particular, as formas humanas (isto é, A β 39, A β 40, A β 41, A β 42 ou A β 43). As sequências destes péptidos e a sua relação com o precursor APP são conhecidas na especialidade (v.g., Hardy et al., TINS 20, 55-158 (1997)). Por exemplo, o A β 42 possui a sequência: H₂N-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-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-OH. (SEQ ID NO: 1).

A β 41, A β 40 e A β 39 diferem de A β 42 pela omissão de Ala, Ala-Ile e Ala-Ile-Val, respectivamente, a partir da extremidade do terminal C do péptido. A β 43 difere de A β 42 pela presença de um resíduo treonina no terminal C. De acordo com uma variante preferida da invenção, os agentes terapêuticos irão induzir uma resposta imune contra todos, ou contra uma porção, do componente de fibrila da doença relevante. Por exemplo, uma composição imunogénica A β preferida é um agente que induz um anticorpo específico para o terminal N livre de A β . Tal composição apresenta a vantagem de não reconhecer a proteína precursora, β -APP, conferindo deste modo uma probabilidade menor de produção de auto-imunidade.

Ainda a título exemplificativo, faz-se observar que os pacientes que padecem de doenças caracterizadas pela deposição de fibrilas AA, por exemplo, determinados distúrbios inflamatórios crónicos, infecções microbianas sistémicas ou locais crónicas e neoplasmas malignos, conforme descrito antes, podem ser tratados com um péptido AA, um fragmento de 8 quilodalton da proteína amilóide A do soro (ApoSSA). Como exemplos de distúrbios amilóides AA refere-se, mas sem que isso constitua qualquer limitação, doenças inflamatórias, tais como artrite reumatóide,

artrite juvenil crónica, espondilite anquilosante, psoríase, artropatia psoriática, síndrome de Reiter, doença de Still do adulto, síndrome de Behçet, doença de Crohn, infecções microbianas crónicas, tais como lepra, tuberculose, bronquiectasia, úlceras decúbita, pielonefrite crónica, osteomielite e doença de Whipple, bem como neoplasmas malignos, tais como linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas do intestino, do pulmão e do tracto uretogenital, carcinoma das células basais e leucemia de células pilosas.

O péptido AA diz respeito a um ou vários de um grupo heterogéneo de péptidos obtidos a partir da proteína precursora amilóide A do soro (ApoSSA) no terminal N, com início no resíduo 1, 2 ou 3 da proteína precursora e finalizando em qualquer ponto entre os resíduos 58 e 84; habitualmente, as fibrilas AA são constituídas pelos resíduos 1 a 76 de ApoSSA. É possível determinar as estruturas precisas e composições e sintetizar péptidos adequados de acordo com métodos bem conhecidos na especialidade (Liepnieks, J. J., et al. *Biochem. Biophys Acta* 1270: 81-86, 1995).

Ainda a título exemplificativo, os fragmentos obtidos a partir da região do terminal N que contém todo ou uma parte do domínio variável (V_L) das cadeias leves de imunoglobulina (cadeia κ ou λ) compreendem geralmente depósitos amilóides em tecidos mesenquimais, provocando neuropatia periférica e autonómica, síndrome do túnel cárpico, macroglossia, cardiomiopatia restrictiva, artropatia das articulações largas, discrasias imunes, mielomas, bem como discrasias ocultas. De preferências, as composições da invenção irão induzir uma resposta imune

contra uma porção da cadeia leve e de preferência contra um "neoepítopo" - um epítopo que é formado como resultado da fragmentação da molécula congénere - para reduzir possíveis efeitos auto-ímmunes.

Diversas doenças amilóides hereditárias também são susceptíveis aos métodos de tratamento da presente invenção. Tais doenças encontram-se descritas na secção B.2, *supra*. Por exemplo, diversas formas de polineuropatia amilóide familiar constituem o resultado pelo menos de cinquenta formas mutantes de transtiretina (TTR) uma proteína com 14 quilodalton produzida pelo fígado, cada uma das quais caracterizada pela modificação de um único aminoácido. Embora muitas destas formas desta doença sejam distinguíveis com base nas suas patologias particulares e/ou origens demográficas, faz-se observar que as composições terapêuticas também podem ser compostas por agentes que induzem uma resposta imune contra mais do que uma forma de TTR, tal como uma mistura de duas ou mais formas de ATTR, incluindo TTR de tipo selvagem, para proporcionar uma composição terapêutica útil.

Os depósitos amilóides que contêm A α oAI podem ser encontrados em pessoas que possuem mutações pontuais na molécula de apolipoproteína AI. Os pacientes com esta forma de doença apresentam geralmente uma neuropatia periférica ou insuficiência renal. De acordo com a presente invenção, as composições terapêuticas são preparadas a partir de uma ou de várias formas de A α oAI aqui descritas ou conhecidas na especialidade.

Determinadas formas familiares da doença de Alzheimer, bem como da síndrome de Down, são o resultado de mutações na proteína precursora amilóide β , dando origem à deposição

de placas que contêm fibrilas constituídas principalmente pelo péptido β -amilóide (A β). A utilização do péptido A β em composições terapêuticas da presente invenção encontra-se descrita antes e é aqui exemplificada.

Outras formulações para o tratamento de formas hereditárias de amiloidose, aqui descritas, compreendem composições que produzem uma resposta imune contra fragmentos de gelsolina para o tratamento de amiloidose sistémica hereditária, proteína lisozima mutante (Alys), para o tratamento de uma neuropatia hereditária, cadeia α mutante de fribrogénio (AfibA) para uma forma não neuropática de amiloidose manifestada como doença renal, cistatina C mutante (Acys) para o tratamento de uma forma de angiopatia cerebral hereditária reportada na Islândia. Além disso, há determinadas formas da doença do prião (v.g., doença de Creutzfeldt-Jacob (CJD), síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) e insónia familiar fatal (FFI)) que são caracterizadas por uma isoforma mutante da proteína do prião, PrP^{Sc}. De acordo com a presente invenção, esta proteína pode ser utilizada em composições farmacêuticas para o tratamento e para a prevenção de deposição de placas de PrP.

Tal como descrito antes, a deposição amilóide, sistémica ou local, também está associada ao envelhecimento. Constitui um outro aspecto da presente invenção que essa deposição seja prevenida ou tratada por meio da administração de composições a indivíduos susceptíveis que contenham uma ou várias proteínas associadas a esse envelhecimento. Assim, as placas constituídas por ATTR obtidas a partir de TTR de tipo selvagem são frequentemente encontradas no tecido do coração de pessoas idosas. De

igual modo, determinados indivíduos idosos podem desenvolver depósitos locais fibrilares assintomáticos de A β no cérebro; o tratamento com péptido A β , conforme aqui descrito minuciosamente, pode ser uma garantia para tais indivíduos. A microglobulina β_2 é um componente frequente de corpos amiláceos da próstata, pelo que constitui um candidato a agente, em conformidade com a presente invenção.

A título exemplificativo, mas sem que isso constitua qualquer limitação, há diversas formas não hereditárias suplementares da doença amilóide que são candidatas aos métodos de tratamento da presente invenção. As placas fibrilares de microglobulina β_2 desenvolvem-se habitualmente em pacientes que são submetidos a hemodiálise ou diálise peritoneal durante períodos longos. De acordo com a presente invenção, tais pacientes podem ser tratados pelo tratamento com composições terapêuticas dirigidas à microglobulina β_2 ou, preferencialmente, aos seus epítomos imunogénicos.

Os tumores que segregam hormonas também podem conter placas amilóides provenientes de hormonas, cuja composição constitui é geralmente característica do órgão endócrino particular afectado. Assim, tais fibrilas podem ser preparadas a partir de hormonas polipeptídicas, tais como calcitonina (carcinoma medular da tiróide), ilhéus de polipéptidos amilóides (que ocorrem na maioria dos pacientes com diabetes de tipo II) e péptidos natriuréticos auriculares (amiloidose auricular isolada). As composições dirigidas a depósitos amilóides que se formam na íntima aórtica em aterosclerose também estão contempladas pela presente invenção. Por exemplo, Westermark, *et al.*, descrevem um fragmento do terminal N

com 69 aminoácidos da apolipoproteína A que forma tais placas (Westermarck, et al. Am. J. Path. 147: 1186-92, 1995); as composições terapêuticas da presente invenção compreendem reagentes imunológicos dirigidos a um tal fragmentos, bem como o próprio fragmento.

A descrição subsequente é focada nos componentes de fibrila amilóide que podem ser utilizados como agentes terapêuticos para o tratamento ou para a prevenção de diversas formas da doença amilóide. O agente terapêutico também pode ser um fragmento activo ou um análogo de um péptido ou proteína de fibrila que ocorre naturalmente ou mutante, que contenha um epítipo que induza uma resposta imune protectora ou terapêutica semelhante na administração a um ser humano. Tipicamente, os fragmentos imunogénicos possuem uma sequência pelo menos de 3, 5, 6, 10 ou 20 aminoácidos contíguos provenientes de um péptido natural. Como exemplos de fragmentos imunogénicos do péptido A β refere-se A β 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 3-7, 1-3, 1-4, 1-12, 13-28, 17-28, 1-28, 25-35, 35-40 e 35-42. Os fragmentos aos quais falta pelo menos um e por vezes pelo menos 5 ou 10 aminoácidos do terminal C presentes em formas que ocorrem naturalmente do componente de fibrila são utilizados em alguns métodos. Por exemplo, um fragmento ao qual lhe falte 5 aminoácidos da extremidade do terminal C de A β 43 compreende os primeiros 38 aminoácidos da extremidade do terminal N de AB. Os fragmentos da metade do terminal N de A β são preferidos em alguns métodos. Como análogos refere-se variantes alélicas, variantes de espécies e variantes induzidas. Tipicamente, os análogos diferem dos péptidos que ocorrem naturalmente numa ou em algumas posições, muitas vezes em virtude de substituições conservadoras.

Tipicamente, os análogos exibem pelo menos 80% ou 90% de identidade de sequência com os péptidos naturais. Alguns análogos também compreendem aminoácidos não naturais ou modificações dos aminoácidos no terminal N ou C. Como exemplos de aminoácidos não naturais refere-se, *v.g.*, aminoácidos α -dissubstituídos, N-alquil-aminoácidos, ácido láctico, 4-hidroxi-prolina, γ -carboxiglutamato, γ -N,N,N-trimetil-lisina, γ -N-acetil-lisina, O-fosfo-serina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 4-metil-histidina, 5-hidroxi-lisina, ω -N-metilarginina.

De um modo geral, faz-se observar aos especialistas na matéria que os fragmentos e análogos concebidos de acordo com este aspecto da invenção podem ser pesquisados quanto à inter-reactividade com componentes de fibrila que ocorrem naturalmente e/ou quanto à eficácia terapêutica ou profiláctica em modelos de animais transgênicos, conforme a seguir se descreve. Tais fragmentos ou análogos podem ser utilizados em composições terapêuticas da presente invenção, se a sua imuno-reactividade e eficácia em modelos animais for praticamente equivalente ou superior do que os parâmetros correspondentes determinados para os componentes de fibrila amilóide.

Tais péptidos, proteínas, fragmentos, análogos e outros péptidos amiloidogênicos podem ser sintetizados através da síntese de péptidos de fase sólida ou através de expressão recombinante, em conformidade com métodos convencionais bem conhecidos na especialidade ou podem ser obtidos a partir de fontes naturais. Exemplos de composições de fibrila, métodos de extracção de fibrilas, sequências de componentes peptídicos ou proteicos de fibrila são proporcionados por muitas das referências

citadas em conjunto com as descrições de componentes de fibrila específicos aqui descritos. Além disso, há outras composições, métodos de extracção e determinação de sequências conhecidos na especialidade que se encontram disponíveis para pessoas que pretendam preparar e utilizar tais composições. É possível utilizar sintetizadores automáticos de péptidos para preparar tais composições, os quais são comercialmente disponibilizados por diversos fabricantes, tais como Applied Biosystems (Perkin Elmer; Foster City, California), e são conhecidos na especialidade procedimentos para a preparação de péptidos sintéticos. A expressão recombinante pode ser numa bactéria, tal como *E. coli*, levedura, células de insectos ou células de mamíferos; em alternativa, as proteínas podem ser produzidas utilizando sistemas de tradução *in vivo* de células livres conhecidos na especialidade. Os procedimentos para a expressão recombinante encontram-se descritos por Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (C. S. H. P. Press, NY, 2^a ed., 1989). Determinados péptidos e proteínas estão comercialmente disponíveis; por exemplo, algumas formas do péptido A β são disponibilizadas por fabricantes, tais como American Peptides Company, Inc., Sunnyvale, California, e California Peptide Research, Inc., Napa, California.

Os agentes terapêuticos também podem ser constituídos por polipéptidos mais longos que compreendem, por exemplo, o fragmento ou análogo da fibrila do péptido activo em conjunto com outros aminoácidos. Por exemplo, o péptido A β pode estar presente como proteína APP intacta ou um seu segmento, tal como o fragmento C-100 que tem início no terminal N de A β e continua até à extremidade de APP. Tais

polipéptidos podem ser pesquisados quanto a eficácia terapêutica ou profiláctica em modelos de animais, conforme descrito *infra*. O péptido A β , análogo, fragmento activo ou outro polipéptido pode ser administrado numa forma associada (isto é, enquanto um péptido amilóide) ou numa forma dissociada. Os agentes terapêuticos também podem compreender multímeros de agentes imunogénicos monoméricos ou de conjugados ou de veículos proteicos e/ou, conforme referido antes, podem ser adicionados a outros componentes de fibrila, para proporcionar um intervalo mais amplo de actividade anti-placas amilóides.

Um péptido imunogénico, tal como um fragmento de A β , pode ser apresentado por meio de um vírus ou de uma bactéria, como parte de uma composição imunogénica. Um ácido nucleico que codifique o péptido imunogénico é incorporado num genoma ou epissoma do vírus ou da bactéria. Facultativamente, o ácido nucleico é incorporado de um modo tal que o péptido imunogénico é expresso como uma proteína segregada ou como uma proteína de fusão com uma proteína da superfície exterior do vírus ou com uma proteína transmembranar de uma bactéria, de forma a que o péptido seja apresentado. Os vírus e bactérias utilizados nestes métodos deverão ser não patogénicos ou atenuados. Como vírus adequados refere-se adenovírus, VHS, vírus da encefalite equina venezuelana e outros vírus α , vírus da estomatite vesicular e outros rabdo-vírus, vacínia e difteria aviária. Como bactérias adequadas refere-se *Salmonella* e *Shigella*. A fusão de um péptido imunogénico com HBsAg de VHB também é particularmente adequada. Os agentes terapêuticos também compreendem péptidos e outros compostos que não possuam necessariamente uma sequência de

aminoácidos significativamente semelhante com A β , mas que mesmo assim possam ser utilizados como miméticos de A β e induzam uma resposta imune semelhante. Por exemplo, quaisquer péptidos e proteínas que formem folhas franzidas β podem ser pesquisados quando à sua adequabilidade. Também podem ser utilizados anticorpos anti-idiotípicos contra anticorpos monoclonais para A β ou outros péptidos amiloidogénicos. Tais anticorpos anti-id imitam o antigénio e geram uma resposta imune contra ele (veja-se *Essential Immunology* (Roit ed., Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, 6^a ed.), pág. 181). Os agentes diferentes de péptidos A β deverão induzir uma resposta imunogénica contra um ou vários dos segmentos preferidos de A β listados antes (v.g., 1-10, 1-7, 1-3 e 3-7). De preferência, tais agentes induzem uma resposta imunogénica que é especificamente dirigida a um desses segmentos sem ser dirigida aos outros segmentos de A β .

Também é possível pesquisar bibliotecas aleatórias de péptidos ou de outros compostos quanto à adequabilidade. As bibliotecas combinatórias podem ser produzidas por diversos tipos de compostos que podem ser sintetizados de um modo passo a passo. Tais compostos compreendem polipéptidos, miméticos beta invertidos, polissacáridos, fosfolípidos, hormonas, prostaglandinas, esteróides, compostos aromáticos, compostos heterocíclicos, benzodiazepinas, glicinas N-substituídas oligoméricas e oligocarbamatos. É possível construir bibliotecas combinatórias amplas de compostos pelo método de bibliotecas sintéticas codificadas (ESL) descritos em Affymax, WO 95/12608, Affymax, WO 93/06121, Columbia University, WO 94/08051, Pharmacopeia, WO 95/35503 e Scripps, WO 95/30642 (os quais se consideram

aqui incorporados por referência para qualquer fim). As bibliotecas de péptidos também podem ser geradas por métodos de apresentação de fagos (*phage display*). Veja-se, v.g., Devlin, WO 91/18980.

As bibliotecas combinatórias e outros compostos são inicialmente pesquisadas quando à sua adequabilidade por meio da determinação da sua capacidade para se ligar a anticorpos ou linfócitos (B ou T), dos quais se sabe que são específicos para A β ou para outros péptidos amiloidogénicos, tais como ATTR. Por exemplo, as pesquisas iniciais podem ser efectuadas com qualquer soro policlonal ou anticorpo monoclonal para A β ou para qualquer outro péptido amiloidogénico relevante. Os compostos identificados em tais pesquisas são então novamente analisados quanto à sua capacidade para induzir anticorpos ou linfócitos reactivos para A β ou para outro péptido amiloidogénico. Por exemplo, podem ser testadas múltiplas diluições de soro em placas de microtitulação que foram pré-revestidas com péptido de fibrila, e é possível submeter a um ensaio ELISA convencional para se testar quanto a anticorpos reactivos para A β . Os compostos podem então ser testados quanto à eficácia profiláctica e terapêutica em animais transgénicos com uma predisposição para uma doença amilóide, conforme descrito nos exemplos. Como exemplos desses animais refere-se murganhos com uma mutação em 717 de APP descritos por Games *et al.*, *supra*, e murganhos com uma mutação sueca em 670/671 de APP, conforme descrito por *et al.*, documento US 5 612 486 e Hsiao *et al.*, *Science* 274,99 (1996); Staufenbiel *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13287-13292 (1997); Sturchler-Pierrat *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13287-13292 (1997); Borchelt *et*

al., Neuron 19,939-945 (1997)). É possível utilizar a mesma abordagem de pesquisa para outros agentes potenciais, tais como fragmentos de A β , análogos de A β e péptidos mais longos que incluam A β , conforme descrito a seguir.

b. Outros componentes de placas

Faz-se observar que as respostas imunológicas dirigidas a outros componentes de placas amilóides também podem ser eficazes para prevenir, retardar ou reduzir a deposição de placas em doenças amilóides. Tais componentes podem ser componentes secundários de fibrilas ou podem estar associados às fibrilas ou à formação de fibrilas nas placas, salientando que os componentes que não são ubíquos ao longo do corpo, ou que são relativamente não específicos dos depósitos amilóides, são normalmente menos adequados para a utilização como alvos terapêuticos.

Assim, constitui uma outra descoberta da presente invenção que os agentes que induzem uma resposta imune contra componentes específicos de placas são úteis para o tratamento ou para a prevenção da progressão de doenças amilóides. Esta secção proporciona antecedentes sobre diversas moléculas exemplificativas associadas a placas amilóides. A indução de uma resposta imune contra qualquer uma destas moléculas, por si só ou em combinação com composições terapêuticas imunogénicas contra os componentes fibrilares descritos antes ou contra quaisquer outros componentes não formadores de fibrilas descritos *infra*, proporciona um regime de tratamento suplementar anti-amilóide, de acordo com a presente invenção. Também pertencem ao âmbito da presente invenção regimes de

imunização com base em tais componentes de placas, conforme aqui descrito.

A título exemplificativo, a sinucleína é uma proteína que é estruturalmente semelhante a apolipoproteínas, mas é encontrada em citossol neuronal, em particular na vizinhança dos terminais pré-sinápticos. Há pelo menos três formas da proteína, designadas por sinucleína α , β e γ . Recentemente, concluiu-se que as sinucleínas α e β estão implicadas na nucleação dos depósitos amilóides em determinadas doenças amilóides, em particular na doença de Alzheimer. (Clayton, D. F., et al., TINS 21 (6): 249-255, 1998). Mais especificamente, um fragmento do domínio NAC de sinucleínas α e β (resíduos 61 a 95) foi isolado a partir de placas amilóides em pacientes com Alzheimer; de facto, este fragmento compreende cerca de 10% de placa que permanece insolúvel após solubilização com dodecil-sulfato de sódio (SDS). (George, J. M., et al. Neurosci. News 1: 12-17, 1995). Além disso, tanto a sinucleína de comprimento completo como o seu fragmento NAC foram descritas como capazes de acelerar a agregação de péptidos β -amilóides em amilóides insolúveis *in vitro*. (Clayton, *supra*).

Componentes suplementares associados a placas amilóides compreendem componentes não peptídicos. Por exemplo, perclano e glicosaminoglicanos provenientes de perclano são proteoglicanos compridos de sulfato de heparina que se encontram presentes em placas amilóides que contêm A β na doença de Alzheimer e outras amiloidoses sistémicas e do SNC, incluindo as placas de amilina associadas à diabetes. Estes compostos demonstraram potenciar a formação de fibrila A β . A proteína nuclear e as cadeias de glicosaminoglicano de perclano demonstraram

participar na ligação a A β . Glicosaminoglicanos suplementares, em particular, sulfato de dermatano, condroitina-4-sulfato e polissulfato de pentosano, são habitualmente encontrados em placas amilóides de diversos tipos e também demonstraram potenciar a formação de fibrila. O sulfato de dextrano possui esta propriedade. Este aumento é significativamente reduzido no caso de as moléculas seres des-sulfatadas. Os terapêuticos imunogénicos dirigidos contra as formas sulfatadas de glicosaminoglicanos, incluindo os próprios glicosaminoglicanos específicos, constituem uma variante suplementar da presente invenção, quer como tratamento primário quer como secundário. A produção de tais moléculas, bem como de composições terapêuticas adequadas que contenham tais moléculas, é do conhecimento dos especialistas na matéria.

2. Agentes que induzem uma resposta imune passiva

Os agentes terapêuticos da invenção também compreendem reagentes imunes, tais como anticorpos, que se ligam especificamente a péptidos de fibrila ou a outros componentes de placas amilóides. Tais anticorpos podem ser monoclonais ou policlonais e possuem especificidades de ligação que são concordantes com o tipo de doença amilóide ao qual são dirigidos. As composições terapêuticas e os regimes de tratamento podem compreender anticorpos dirigidos a um único domínio ou epítopo de ligação de um componente particular de fibrila ou não fibrila da placa, ou podem compreender anticorpos dirigidos a dois ou mais epítotos do mesmo componente ou anticorpos dirigidos a epítotos em múltiplos componentes da placa.

Por exemplo, nas experiências efectuadas para apoiar a presente invenção, foram administradas a murganhos PDAPP com 8 1/2 a 10 1/2 meses de idade injeções intraperitoneais (i.p.) de anticorpos policlonal anti-A β 42 ou monoclonais anti-A β , preparados contra epítomos específicos do péptido A β , ou de soluto salino, conforme aqui apresentado mais minuciosamente no exemplo XI. Nestas experiências, foram monitorizadas as concentrações de anticorpo em circulação e foram administradas injeções de reforço conforme necessário para manter uma concentração de anticorpo em circulação superior a 1:1000 no que diz respeito ao antigénio específico para o qual se preparou o anticorpo. Foram observadas reduções nos níveis totais de A β , em comparação com o controlo, nas regiões cerebrais do córtex, do hipocampo e do cerebelo de murganhos tratados com o anticorpo; nestes estudos, as reduções mais elevadas foram exibidas pelos murganhos tratados com anticorpos policlonais.

Noutras experiências efectuadas para apoiar a presente invenção, foi utilizado um ensaio de previsão *ex vivo* (exemplo XIV) para testar a limpeza de um anticorpo contra um fragmento de sinucleína, designado por NAC. A sinucleína demonstrou ser uma proteína associada a placas amilóides. Efectuou-se o contacto de um anticorpo para NAC com uma amostra de tecido cerebral que continha placas amilóides e células microgliais. Utilizou-se soro de coelho como controlo. A monitorização subsequente revelou uma redução significativa no número e no tamanho das placas, indicando uma actividade de limpeza do anticorpo.

A partir destes dados, concluiu-se que a carga de placa amilóide associada à doença de Alzheimer e a outras

doenças amilóides pode ser significativamente reduzida por meio da administração de reagentes imunes dirigidos contra epítomos do péptido A β ou contra o fragmento NAC de sinucleína, os quais são eficazes para a redução da carga em placas amilóides. Faz-se ainda observar que é possível utilizar diversos anticorpos em tais composições. Os anticorpos que se ligam especificamente à forma agregada de A β sem no entanto se ligarem à forma desagregada são adequados para a utilização na invenção, tal como são os anticorpos que se ligam especificamente a forma desagregada sem no entanto se ligarem à forma agregada. Há outros anticorpos adequados que se ligam às formas agregada e desagregada. Alguns destes anticorpos ligam-se à forma curta que ocorre naturalmente de A β (isto é, A β 39, 40 ou 41), sem se ligarem à forma longa que ocorre naturalmente de A β (isto é, A β 42 e A β 43). Alguns anticorpos ligam-se à forma longa sem se ligarem à forma curta. Alguns anticorpos ligam-se a A β sem se ligarem à proteína precursora amilóide de comprimento completo. Alguns anticorpos ligam-se a A β com uma afinidade de ligação superior ou igual a cerca de 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 ou 10^{10} M⁻¹.

Tipicamente, o soro policlonal contém populações misturadas de anticorpos que se ligam a diversos epítomos ao longo do comprimento de A β . Os anticorpos monoclonais ligam-se a um epítomo específico dentro de A β , o qual pode ser um epítomo conformacional ou não conformacional. Alguns anticorpos monoclonais ligam-se a um epítomo nos resíduos 1 a 28 de A β (sendo o primeiro resíduo do terminal N de A β natural designado por 1). Há outros anticorpos monoclonais que se ligam a um epítomo nos resíduos 1 a 10 de A β . Também existem anticorpos monoclonais que se ligam a um epítomo

nos resíduos 1 a 16 de A β . Há outros anticorpos monoclonais que se ligam a um epítipo com resíduos 1 a 25 de A β . Há alguns anticorpos monoclonais que se ligam a um epítipo com os aminoácidos 1-5, 5-10, 10-15, 15-20, 25-20, 10-20, 20, 30 ou 10-25 de A β . A eficácia terapêutica ou profiláctica dos anticorpos pode ser testada utilizando os procedimentos de modelos de animais transgênicos descritos nos exemplos.

De um modo geral, a partir dos ensinamentos aqui descritos, os especialistas na matéria podem conceber, produzir e testar anticorpos dirigidos a proteínas ou péptidos de fibrila característicos de outras doenças amilóides, tais como as doenças aqui descritas na secção 2, utilizando as composições aqui descritas, bem como os anticorpos contra outros componentes amilóides.

a. Características gerais de imunoglobulinas

Sabe-se que a unidade estrutural básica do anticorpo compreende um tetrâmero de subunidades. Cada tetrâmero é constituído por dois pares idênticos de cadeias polipeptídicas, em que cada par possui uma cadeia "leve" (cerca de 25 kDa) e uma cadeia "pesada" (cerca de 50 a 70 kDa). A porção do terminal amino de cada cadeia compreende uma região variável com cerca de 100 a 110 ou mais aminoácidos que são os responsáveis principais pelo reconhecimento do antigénio. A porção do terminal carboxi de cada cadeia define uma região constante que é a responsável principal pela função efectora.

As cadeias leves são classificadas como κ ou λ . As cadeias pesadas são classificadas como γ , μ , α , δ ou ϵ , e definem o isotipo do anticorpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Nas cadeias leve e pesada, as regiões

constante e variável são unidas por uma região "J" com cerca de 12 ou mais aminoácidos, em que a cadeia pesada inclui ainda uma região "D" com cerca de 10 ou mais aminoácidos. (Veja-se *Fundamental Immunology* (Paul, W., cd., 2ª cd. Raven Press, N. Y., 1989), Cap. 7 (aqui incorporado na sua totalidade por referência para todos os fins)).

As regiões variáveis de cada par de cadeias leve/pesada formam o local de ligação do anticorpo. Assim, um anticorpo intacto possui dois locais de ligação. Com a exceção de anticorpos bi-funcionais ou bi-específicos, os dois locais de ligação são os mesmos. Todas as cadeias exibem a mesma estrutura geral de regiões com regiões estruturais relativamente conservadas (FR) unidas por três regiões hiper-variáveis, também designadas por regiões de determinação da complementaridade ou CDR. As CDR das duas cadeias de cada par são alinhadas pelas regiões estruturais, o que permite a ligação a um epítipo específico. A partir do terminal N até ao terminal C, as cadeias leve e pesada compreendem os domínios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. A atribuição de aminoácidos para cada domínio é efectuada em conformidade com as definições de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 e 1991), ou de Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987); Chothia et al., *Nature* 342: 878-883 (1989).

b. Produção de anticorpos não humanos

A produção de anticorpos monoclonais não humanos, v.g., de murganho, cobaia, coelho ou rato, pode ser efectuada, por exemplo, por imunização do animal com um

componente da placa, tal como A β ou outros componentes de fibrila. Também é possível utilizar um péptido mais comprido que compreende A β ou um fragmento imunogénico de A β ou anticorpos anti-idiotípicos para um anticorpo contra A β . Ver, v.g., Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988) (incorporado por referência para todos os fins). Um tal imunogénio pode ser obtido a partir de uma fonte natural, por síntese de péptidos ou por expressão recombinante. Facultativamente, o imunogénio pode ser administrado numa forma fundida ou de um outro modo complexado com um veículo proteico, conforme a seguir se descreve. Facultativamente, o imunogénio pode ser administrado com um adjuvante. É possível utilizar diversos tipos de adjuvante, tal como a seguir se descreve. De preferência, utiliza-se adjuvante completo de Freund seguido de adjuvante incompleto de Freund para a imunização de animais de laboratório. Tipicamente, utiliza-se coelhos ou cobaias para a produção de anticorpos policlonais. Os murganhos são tipicamente utilizados para a produção de anticorpos monoclonais. Os anticorpos são pesquisados quanto a uma ligação específica para o imunogénio. Facultativamente, os anticorpos são ainda pesquisados quanto à ligação a uma região específica do imunogénio. Por exemplo, no caso do péptido A β enquanto imunogénio, a pesquisa pode ser efectuada por meio da determinação da ligação de um anticorpo a uma colecção de mutantes de supressão de mutante de um péptido A β e por meio da determinação de qual mutantes de supressão se ligam ao anticorpo. A ligação pode ser testada, por exemplo, por meio das análises de transferência de Western ou de ELISA. O fragmento mais pequeno que apresente uma ligação específica ao anticorpo

designa o epítopo do anticorpo. Em alternativa, a especificidade do epítopo pode ser determinada por meio de um ensaio de competição em que um anticorpo de teste e um anticorpo de referência competem pela ligação ao componente. No caso de os anticorpos de teste e de referência competirem, então ligam-se ao mesmo epítopo ou a epítopos suficientemente próximos, para os quais a ligação de um anticorpo interfere com a ligação do outro.

c. Anticorpos quiméricos e humanizados

Os anticorpos quiméricos e humanizados possuem a mesma, ou semelhante, especificidade e afinidade de ligação do que um anticorpo de murganho ou outro anticorpo não humano, que proporcione o material de partida para a construção de um anticorpo quimérico ou humanizado. Os anticorpos quiméricos são anticorpos cujos genes das cadeias leve e pesada foram construídos, tipicamente por manipulação genética, a partir de segmentos de genes de imunoglobulina que pertencem a espécies diferentes. Por exemplo, os segmentos variáveis (V) de genes provenientes de um anticorpo monoclonal de murganho podem ser unidos a segmentos constantes (C) humanos, tais como IgG1 e IgG4. Assim, um anticorpo quimérico típico é uma proteína híbrida constituída pelo domínio V ou domínio de ligação ao antigénio proveniente de um murganho e o domínio C ou domínio efector proveniente de um anticorpo humano.

Os anticorpos humanizados possuem resíduos estruturais da região variável provenientes substancialmente de um anticorpo humano (designado por anticorpo aceitador) e regiões determinantes complementares provenientes substancialmente de um anticorpo de murganho (designado por

imunoglobulina dadora). Ver, Queen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033 (1989) e os documentos WO 90/07861, US 5 693 762, US 5 693 761, US 5 585 089, US 5 530 101 e Winter, US 5 225 539 (incorporados na sua totalidade por referência para todos os fins). Se presente, a(s) região(ões) constante(s), também são provenientes, total ou substancialmente, de uma imunoglobulina humana. Os domínios variáveis humanos são normalmente seleccionados a partir de anticorpos humanos cujas sequências estruturais exibem um grau elevado de identidade de sequência com os domínios variáveis de murinos, a partir dos quais são obtidos os CDR. Os resíduos estruturais da região variável das cadeias pesada e leve podem ser obtidos a partir das mesmas sequências de anticorpo humano, ou de diferentes sequências. As sequências de anticorpo humano podem ser sequências de anticorpos que ocorrem naturalmente ou podem ser sequências de consenso de diversos anticorpos humanos. Ver, Carter *et al.*, WO 92/22653. Há determinados aminoácidos provenientes de resíduos estruturais da região variável humana que são seleccionados para substituição, com base na sua possível influência na conformação de CDR e/ou de ligação ao antigénio. A investigação de tais possíveis influências é efectuada por modulação, por meio de um exame às características dos aminoácidos em localizações particulares ou a observações empíricas dos efeitos da substituição ou mutagénese de aminoácidos particulares.

Por exemplo, no caso de um aminoácido apresentar diferenças entre um resíduo estrutural da região variável de murino e um resíduo estrutural da região variável de um ser humano, então o aminoácido estrutural humano deverá ser

normalmente substituído pelo equivalente aminoácido estrutural do anticorpo de murino, quando seja razoavelmente expectável que o aminoácido:

- (1) se ligue directamente de um modo não covalente ao antigénio,
- (2) esteja adjacente a uma região CDR,
- (3) interactue de um outro modo com uma região CDR (v.g., esteja a cerca de 6 Å da região CDR) ou
- (4) participe na região VL-VH.

Como outros candidatos a substituição refere-se os aminoácidos estruturais aceitadores humanos que não sejam habituais para a imunoglobulina humana nessa posição. Estes aminoácidos podem ser substituídos com aminoácidos provenientes de uma posição equivalente de um anticorpo dador de murganho ou provenientes de posições equivalentes de imunoglobulinas humanas mais típicas. Como outros candidatos a substituição refere-se os aminoácidos estruturais aceitadores humanos que não sejam habituais para uma imunoglobulina humana nessa posição. As regiões variáveis estruturais de imunoglobulinas humanizadas apresentam normalmente pelo menos 85% de identidade de sequência com uma sequência estrutural da região variável humana ou um consenso de tais sequências.

d. Anticorpos humanos

Os anticorpos humanos contra A β são proporcionados por diversas técnicas a seguir descritas. Alguns anticorpos humanos são seleccionados por experiências de ligação competitiva ou então apresentam a mesma especificidade para o epítopo do que um anticorpo particular de murganho, tal como um dos anticorpos monoclonais de murganho descritos no

exemplo XI. Os anticorpos humanos também podem ser pesquisados quanto à especificidade para um epítipo particular por meio da utilização apenas de um fragmentos de A β enquanto imunogénio e/ou por pesquisa de anticorpos contra um conjunto de mutantes de supressão de A β .

(1) Metodologia Trioma

A abordagem básica, bem como um parceiro de fusão celular exemplificativo, SPAZ-4, utilizáveis nesta abordagem foram já descritos por Oestberg et al., Hybridoma 2: 361-367 (1983); Oestberg, patente de invenção norte-americana nº 4 634 664; e Engleman et al., patente de invenção norte-americana nº 4 634 666 (as quais se consideram aqui incorporadas na sua totalidade por referência para todos os fins). As linhagens celulares que produzem o anticorpo obtidas por meio deste método são designadas por triomas, uma vez que são obtidas a partir de três células - duas humanas e uma de murganho. Inicialmente, efectua-se a fusão de uma linhagem de mieloma de murganho com um linfócito B humano para se obter uma célula híbrida xenogénica que não produz o anticorpo, tal como a linhagem de célula SPAZ-4 descrita por Oestberg, *supra*. A célula xenogénica é então fundida com um linfócito B humano imunizado para se obter uma linhagem de célula de trioma que produz o anticorpo. Concluiu-se que as triomas produzem o anticorpo de um modo mais estável do que os hibridomas comuns preparados a partir de células humanas.

Os linfócitos B imunizados são obtidos a partir do sangue, do baço, dos nódulos linfáticos ou da medula óssea de um dador humano. No caso de se pretender anticorpos contra um antigénio ou epítipo específico, então é

preferível utilizar esse antigénio ou um seu epítopo para a imunização. A imunização pode ser efectuada *in vivo* ou *in vitro*. Para a imunização *in vivo*, as células B são tipicamente isoladas a partir de um ser humano imunizado com A β , um seu fragmento, um polipéptido comprimido que contém A β ou um fragmento ou um anticorpo anti-idiotípico de um anticorpo de A β . De acordo com alguns métodos, as células B são isoladas a partir do paciente ao qual será administrada a terapia com o anticorpo. Para a imunização *in vitro*, os linfócitos β são tipicamente expostos ao antigénio durante um período compreendido entre 7 e 14 dias num meio, tal como RPMI-1640 (ver Engleman, *supra*) com um suplemento de 10% de plasma humano.

Os linfócitos B imunizados são fundidos com uma célula híbrida xenogénica, tal como SPAZ-4, utilizando métodos bem conhecidos. Por exemplo, as células são tratadas com 40%-50% de polietileno-glicol com um PM de 1000-4000, a cerca de 37°C, durante 5 a 10 minutos. As células são separadas da mistura de fusão e propagadas num meio selectivo para os híbridos desejados (*v.g.*, HAT ou AH). Os anticorpos que segregam clones com a especificidade de ligação necessária são identificados por meio de testes ao meio de cultura de trioma quanto à sua aptidão para se ligarem a A β ou a um seu fragmento. As triomas que produzem anticorpos humanos que possuem a especificidade desejada são subclonados através da técnica de diluição limitada e são deixados a desenvolver *in vitro* em meio de cultura. As linhagens de células de triomas são então testadas quanto à sua aptidão para se ligar a A β ou a um seu fragmento.

Embora as triomas sejam geneticamente estáveis, não produzem anticorpos em níveis muito elevados. Os níveis de

expressão podem ser aumentados por meio de clonagem de genes do anticorpo a partir da trioma num ou em vários vectores de expressão, e transformando o vector em linhagens de células de mamíferos, de bactérias ou de leveduras, de acordo com métodos bem conhecidos na especialidade.

(2) Mamíferos transgênicos não humanos

Os anticorpos humanos contra A β também podem ser produzidos a partir de mamíferos transgênicos não humanos que possuam transgenes que codifiquem pelo menos um segmento do local de imunoglobulina humana. Normalmente, o local endógeno de imunoglobulina de tais mamíferos transgênicos está funcionalmente inactivo. De preferência, o segmento do local de imunoglobulina humana compreende sequências não arranjadas de componentes de cadeias pesada e leve. Tanto a inactivação de genes endógenos de imunoglobulina como a introdução de genes exógenos de imunoglobulina podem ser alcançadas por meio de recombinação homóloga dirigida ou por introdução de cromossomas YAC. Os mamíferos transgênicos resultantes deste processo são capazes de rearranjar funcionalmente as sequências do componente de imunoglobulina e expressar um conjunto de anticorpos de diversos isotipos codificados pelos genes de imunoglobulina humanos, sem expressarem os genes endógenos de imunoglobulina. A produção e as propriedades de mamíferos que possuem estas propriedades encontram-se descritas mais minuciosamente, *v.g.*, por Lonberg *et al.*, e nos documentos WO 93/12227 (1993); US 5 877 397, US 5 874 299, US 5 814 318, US 5 789 650, US 5 770 429, US 5 661 016, US 5 633 425, US 5 625 126, US 5 569

825, US 5 545 806, Nature 148, 1547-1553 (1994), Nature Biotechnology 14, 826 (1996), Kucherlapati, WO 91/10741 (1991) (as quais são incorporadas na sua totalidade por referência, para todos os fins). Os murganhos transgênicos são particularmente adequados para este fim. OS anticorpos anti-A β são obtidos por imunização de um mamífero transgênico não humano, tal como descrito por Lonberg ou Kucherlapati, *supra*, com A β ou um seu fragmento. Os anticorpos monoclonais são preparados, v.g., por fusão de células B provenientes de tais animais com linhas de células de mieloma adequadas, utilizando a tecnologia convencional de Kohler-Milstein. Os anticorpos policlonais humanos também podem ser obtidos sob a forma de soro a partir de humanos imunizados com um agente imunogênico. Facultativamente, tais anticorpos policlonais podem ser concentrados por meio de purificação por afinidade, utilizando A β ou outro péptido amilóide imunogénio enquanto reagente de afinidade.

(3) Métodos de apresentação de fagos

Uma outra abordagem para a obtenção de anticorpos anti-A β humanos consiste no rastreamento de uma biblioteca de ADN de células B humanas, de acordo com o protocolo geral descrito por Huse *et al.*, Science 246: 1275-1281 (1989). Por exemplo, conforme descrito na metodologia de trioma, tais células B podem ser obtidas a partir de um ser humano imunizado com A β , fragmentos, polipéptidos compridos que contêm A β ou fragmentos ou anticorpos anti-idiotípicos. Facultativamente, tais células B são obtidas a partir do paciente ao qual se irá administrar o tratamento com anticorpo. São seleccionados os anticorpos que se ligam a

um epítopo do componente amilóide relevante, tal como A β ou um seu fragmento. As sequências que codificam tais anticorpos (ou fragmentos de ligação) são então clonadas e amplificadas. O protocolo descrito pode Huse tem demonstrado ser mais eficaz em combinação com a tecnologia de apresentação de fagos. Veja-se, v.g., Dower *et al.*, WO 91/17271 e McCafferty *et al.*, WO 92/01047, US 5 877 218, US 5 871 907, US 5 858 657, US 5 837 242, US 5 733 743 e US 5 565 332 (as quais são aqui incorporadas na sua totalidade por referência, para qualquer fim). Nestes métodos, são produzidos bibliotecas de fagos em que os membros apresentam anticorpos diferentes nas suas superfícies exteriores. Os anticorpos são normalmente apresentados como fragmentos Fv ou Fab. Os anticorpos de apresentação de fagos que possuem a especificidade desejada são seleccionados por enriquecimento de afinidade para um péptido A β ou um seu fragmento.

De acordo com uma variante do método de apresentação de fagos, é possível produzir os anticorpos humanos que possuem a especificidade de ligação de um anticorpo de murino seleccionado. Veja-se, Winter, WO 92/20791. Neste método, utiliza-se a região variável da cadeia pesada ou leve do anticorpo de murino seleccionado como material de partida. Por exemplo, no caso de se seleccionar a região variável de cadeia leve como material de partida, então é construído uma biblioteca de fagos em que os membros apresentam a mesma região variável de cadeia leve (isto é, o material de partida de murino) e uma região variável de cadeia pesada diferente. As regiões variáveis de cadeia pesada são obtidas a partir de uma biblioteca de regiões variáveis de cadeia pesada humanas rearranjadas. É

seleccionado um fago que apresente uma ligação específica forte para o componente relevante (v.g., pelo menos 10^8 M⁻¹ e preferencialmente pelo menos 10^9 M⁻¹). A região variável de cadeia pesada humana deste fago é então utilizada como material de partida para a construção de outra biblioteca de fagos. Nesta biblioteca, cada fago apresenta a mesma região variável de cadeia pesada (isto é a região identificada na primeira biblioteca de apresentação) e uma região variável de cadeia leve diferente. As regiões variáveis de cadeia leve são obtidas a partir de uma biblioteca de regiões variáveis de cadeia leve humanas rearranjadas. Novamente, é seleccionado o fago que apresente uma ligação específica forte para o componente de péptido amilóide. Estes fagos apresentam as regiões variáveis de anticorpos de péptidos anti-amilóides totalmente humanos. Estes anticorpos possuem normalmente uma especificidade para um epítipo igual ou semelhante à do material de partida do murino.

e. Selecção da região constante

As regiões variáveis de cadeias pesada e leve de anticorpos quiméricos, humanizados ou humano podem ser ligadas pelo menos a uma porção de uma região constante humana. A escolha da região constante depende, em parte, de se desejar um complemento dependente de anticorpo e/ou uma toxicidade mediada por células. Por exemplo, os isotipos IgG1 e IgG3 possuem actividade complementar ao passo que os isotipos IgG2 e IgG4 não. A selecção do isotipo também pode afectar a passagem do anticorpo para o cérebro. As regiões de cadeia leve podem ser λ ou κ . Os anticorpos podem ser expressos sob a forma de tetrâmeros que contêm 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 singular, nos quais os domínios variáveis de cadeia pesada e leve estão ligados por meio de um ligador.

f. Expressão de anticorpos recombinantes

Os anticorpos quiméricos, humanizados e humanos são tipicamente produzidos por expressão recombinante. As construções de polipéptidos recombinantes compreendem tipicamente uma sequência de controlo de expressão que está funcionalmente ligada às sequências codificadoras das cadeias do anticorpo, incluindo as regiões promotoras associadas naturalmente ou heterólogas. De preferência, as sequências de controlo de expressão são sistemas promotores eucarióticos em vectores capazes de transformar ou transfectar células hospedeiras eucarióticas. Após a incorporação do vector no hospedeiro adequado, o hospedeiro é mantido sob condições adequadas para a expressão de nível elevado das sequências de nucleótidos e recolha e purificação dos anticorpos de inter-reacção.

Estes vectores de expressão são tipicamente replicáveis em organismos hospedeiros quer sob a forma de episomas quer como parte integrante do ADN cromossómico do hospedeiro. Habitualmente, os vectores de expressão contêm marcadores de selecção, *v.g.*, resistência a ampicilina ou resistência a higromicina, para permitir a detecção dessas células transformadas com as sequências de ADN desejadas.

E. coli é um hospedeiro procariótico particularmente útil para a clonagem de sequências de ADN da presente invenção. Os micróbios, tais como leveduras, também são

úteis para a expressão. As *Saccharomyces* são um hospedeiro de leveduras preferível, com vectores adequados que possuem sequências de controlo de expressão, uma origem de replicação, sequências de terminação e semelhantes, conforme desejado. Como promotores típicos refere-se 3-fosfoglicerato-cinase e outras enzimas glicolíticas. Como promotores indutíveis de leveduras refere-se, entre outros, os promotores de álcool desidrogenase, isocitocromo C e enzimas responsáveis pela utilização de maltose e de galactose.

As células de mamíferos constituem um hospedeiro preferido para a expressão de segmentos nucleotídicos que codificam imunoglobulinas ou seus fragmentos. Veja-se Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). Há diversas linhas de células hospedeiras adequadas capazes de secretar proteínas heterólogas intactas que foram desenvolvidas na especialidade, as quais compreendem linhas de células de CHO, diversas linhas de células COS, células HeLa, células L e linhas de células de mieloma. Os vectores de expressão para estas células podem incluir sequências de controlo de expressão, tais como uma origem de replicação, um promotor, um potenciador (Queen *et al.*, *Immunol. Rev.* 89: 49 (1986)), e locais de informação de processamento necessários, tais como locais de ligação de ribossomas, locais de união de ARN, locais de poliadenilação e sequências terminadoras de transcrição. Como sequências de controlo de expressão preferidas refere-se os promotores obtidos a partir de genes endógenos, citomegalovírus, SV40, adenovírus, vírus papiloma de bovino e semelhantes. Ver Co *et al.*, *J. Immunol.* 148: 1149 (1992).

Em alternativa, é possível incorporar em transgenes sequências que codifiquem o anticorpo para a introdução no genoma de um animal transgénico e subsequente expressão no leite do animal transgénico (v.g., de acordo com os métodos descritos nos documentos US 5 741 957, US 5 304 489, US 5 849 992, os quais se consideram aqui incorporados na sua totalidade por referência). Como transgenes adequados refere-se as sequências codificadoras para as cadeias leve e/ou pesada numa ligação funcional com um promotor e potenciador proveniente de um gene específico da glândula mamária, tal como caseína ou β -lactoglobulina.

Os vectores que contêm os segmentos de ADN relevantes podem ser transferidos para a célula hospedeira por meio de métodos bem conhecidos, em função do tipo de hospedeiro celular. Por exemplo, a transfecção de cloreto de cálcio é bastante utilizada para células procarióticas, ao passo que o tratamento de fosfato de cálcio, electroporação, lipofecção, biolístico ou transfecção à base de vírus pode ser utilizado para outros hospedeiros celulares. Como outros métodos utilizados para transformar células de mamíferos refere-se a utilização de polibreno, fusão de protoblastos, lipossomas, electroporação e micro-injecção (veja-se Sambrook et al., *supra*). Para a produção de animais transgénicos, é possível administrar por micro-injecção os transgenes a oócitos fertilizados ou então é podem ser incorporados no genoma de células estaminais embrionárias, sendo o núcleo de tais células transferido para oócitos enucleados.

Após a expressão, os anticorpos podem ser purificados de acordo com procedimentos convencionais conhecidos na especialidade, incluindo purificação por HPLC,

cromatografia em coluna, electroforese em gel e semelhantes (veja-se Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)).

4. Outros agentes terapêuticos

Os agentes terapêuticos utilizáveis nos métodos da presente invenção também compreendem células T que se ligam a um componente da placa, tal como o péptido A β . Por exemplo, as células T podem ser activadas contra o péptido A β por expressão de um gene MHC de classe I humano e de um gene de β -2-microglobulina humano a partir de uma linhagem de células de insecto, em que se forma um complexo vazio sobre a superfície das células, o qual se pode ligar ao péptido A β . As células T que contactaram com a linhagem de células tornam-se especificamente activadas contra o péptido. Veja-se Peterson et al., US 5,314,813. As linhagens de células de insectos que expressam um antigénio MHC de classe II também podem ser igualmente utilizadas para activar as células T CD4.

5. Veículos proteicos

Alguns agentes para a indução de uma resposta imune contêm o epítipo adequado para induzir uma resposta imune contra os depósitos amilóides, embora sejam demasiado pequenos para serem imunogénicos. Nesta situação, é possível ligar um péptido imunogénico a um veículo adequado para auxiliar a obtenção de uma resposta imune. Como veículos adequados refere-se albuminas do soro, hemocianina de *diodora* *apertura*, moléculas de imunoglobulina, tiroglobulina, ovalbumina, toxóide do tétano ou um toxóide proveniente de outra bactéria patogénica, tal como

difteria, *E. coli*, cólera ou *H. pylori*, ou um derivado de toxina atenuado. Como outros veículos refere-se epítomos de células T que se ligam a alelos múltiplos de MHC, v.g., a pelo menos 75% de todos os alelos MHC humanos. Tais veículos são por vezes designados na especialidade como “epítomos de células T universais”. Como exemplos de epítomos de células T universais refere-se:

Hemaglutinina de influenza: HA₃₀₇₋₃₁₉ **PKYVKQNTLKLAT** (SEQ ID NO: 1)

PADRE (resíduos comuns a negrito) **AKXVAAWTLKAAA** (SEQ ID NO: 2)

Malária CS: epítomo T3 EKKIAKMEKASSVFNV (SEQ ID NO: 3)

Antigénio da superfície de hepatite B: HBsAg₁₉₋₂₈
FFLLTRILTI (SEQ ID NO: 4)

Proteína 65 de choque térmico: hsp65₁₅₃₋₁₇₁
DQSIGDLIAEAMDKVGN (SEQ ID NO: 5)

Bacilo Calmette-Guerin: QVHFQPLPPAVVKL (SEQ ID NO: 6)

Toxóide do tétano: TT₈₃₀₋₈₄₄ QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 7)

Toxóide do tétano: TT₉₄₇₋₉₆₇ FNNFTVSFWRVLPKVSASHLE (SEQ ID NO: 8)

VIH gp120 T1: KQIINMWQEVGKAMYA. (SEQ ID NO: 9)

Como outros veículos para estimular ou potenciar uma resposta imune refere-se citoquinas, tais como IL-1, IL-1 α e péptidos β , IL-2, γ INF, IL-10, GM-CSF e quimoquinas, tais como MIP1 α e RANTES. Os agentes imunogénicos também podem estar ligados a péptidos que potenciem o transporte através de tecidos, conforme descrito por O'Mahony, nos documentos WO 97/17613 e WO 97/17614.

Os agentes imunogénicos podem ser ligados a veículos por reticulação química. As técnicas para ligar um

imunogénio a um veículo compreendem a formação de ligações dissulfureto utilizando propionato de N-succinimidil-3-(2-piridil-tio) (SPDP) e 4-(N-maleimidometil)-ciclo-hexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC) (no caso de faltar ao péptido um grupo sulfidrilo, este pode ser proporcionado por meio da adição de um resíduo cisteína). Estes reagentes criam uma ligação dissulfureto entre eles próprios e os resíduos cisteína do péptido numa proteína e uma ligação amida através de ϵ -amino numa lisina ou outro aminoácido livre em outros aminoácidos. No documento Immun. Rev. 62, 185 (1982) encontram-se descritos diversos agentes formadores de tais dissulfureto/amida. Outros agentes de acoplamento bifuncional formam um tioéter em vez de uma ligação dissulfureto. Muitos destes agentes formadores de tio-éter encontram-se comercialmente disponíveis e compreendem ésteres reactivos de ácido 6-maleidimido-capróico, ácido 2-bromoacético, ácido 2-iodoacético e ácido 4-(N-meleidimido-metil)-ciclo-hexano-1-carboxílico. Os grupos carboxilo podem ser activados por meio da sua combinação com succinimida ou com sal de sódio do ácido 1-hidroxil-2-nitro-4-sulfónico.

Os péptidos imunogénicos também podem ser expressos, como proteínas de fusão, com veículos (isto é, péptidos heterólogos). O péptido imunogénico pode ser ligado por meio do seu terminal amino, terminal carboxilo ou ambos ao veículo. Facultativamente, podem estar presentes múltiplas repetições do péptido imunogénico na proteína de fusão. Facultativamente, um péptido imunogénico pode ser ligado a múltiplas cópias de um péptido heterólogo, por exemplo, nos terminais N e C do péptido. Alguns veículos de péptidos são utilizados para induzir uma resposta de células T

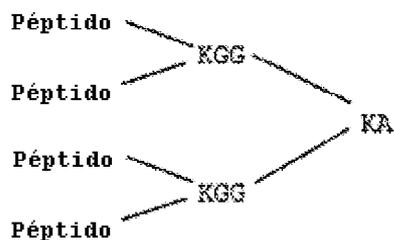
auxiliares contra o veículo peptídico. Por sua vez, as células T induzidas auxiliares induzem uma resposta contra o péptido imunogénico ligado ao veículo peptídico.

Alguns agentes da invenção compreendem uma proteína de fusão, na qual um fragmento do terminal N de A β está ligado pelo seu terminal C a um veículo peptídico. Em tais agentes, o resíduo do terminal N do fragmento de A β constitui o resíduo do terminal N da proteína de fusão. Assim sendo, tais proteínas de fusão são eficazes para a indução de anticorpos que se ligam a um epítopo para o qual seja necessário que resíduo do terminal N de A β esteja sob uma forma livre. Alguns agentes da invenção compreendem diversas repetições de um segmento do terminal N de A β ligadas pelo terminal C a uma ou várias cópias de veículo peptídico. O fragmento do terminal N de A β incorporado em tais proteínas de fusão tem início, por vezes, em A β 1-3 e termina em A β 7-11. Como fragmentos do terminal N de A β preferidos refere-se A β 1-7, A β 1-3, 1-4, 1-5 e 3-7. Algumas proteínas de fusão compreendem diferentes segmentos do terminal N de A β em linha. Por exemplo, uma proteína de fusão pode compreender A β 1-7 seguida por A β 1-3 seguida por um péptido heterólogo.

Em algumas proteínas de fusão, um segmento do terminal N de A β é fundido na sua extremidade do terminal N a um veículo peptídico heterólogo. É possível utilizar a mesma variedade de segmentos do terminal N de A β para as fusões do terminal C. Algumas proteínas de fusão compreendem um péptido heterólogo ligado ao terminal N de um segmento do terminal N de A β , o qual está ligado por sua vez a um ou vários segmentos do terminal N de A β suplementares em linha.

A seguir são apresentados alguns exemplos de proteínas de fusão adequadas para utilização de acordo com a invenção. Algumas destas proteínas de fusão compreendem segmentos de A β ligados a epítomos de toxóide do tétano, tais como os descritos nos documentos US 5 196 512, EP 378 881 e EP 427 347. Algumas proteínas de fusão compreendem segmentos de A β ligados a veículos peptídicos descritos nos documentos US 5 736 142. Alguns péptidos heterólogos são epítomos de células T universais. Em alguns métodos, o agente para administração é simplesmente uma proteína de fusão com um segmento de A β ligado a um segmento heterólogo numa configuração linear. Em alguns métodos, o agente é um multímero de proteínas de fusão representado pela fórmula 2^x, em que x representa um número inteiro compreendido entre 1 e 5. De preferência, x representa 1, 2 ou 3 e mais preferencialmente 2. No caso de x representar 2, então tal multímero possui quatro proteínas de fusão ligadas, numa configuração preferida, sendo designado por MAP4 (ver US 5 229 490). Os epítomos de A β estão sublinhados.

A configuração MAP4 é a seguir apresentada, em que as estruturas ramificadas são produzidas por meio de uma síntese peptídica inicial no terminal N e nas cadeias laterais de aminas da lisina. Em função do número de vezes que a lisina é incorporada na sequência e é permitida a sua ramificação, a estrutura resultante irá apresentar múltiplos terminais N. Neste, exemplo, foram produzidos quatro terminais N idênticos no núcleo que contém a lisina ramificada. Tal multiplicidade potencia bastante a reactividade de células B congéneres.



AN90549 (A β 1-7/toxóide de tétano 830-844 numa configuração MAP4): DAEFRHDQYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 10)

AN90550 (A β 1-7/toxóide de tétano 947-967 numa configuração MAP4): DAEFRHDFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 11)

AN90542 (A β 1-7/toxóide de tétano 830-844 + 947-967 numa configuração linear):

DAEFRHDQYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 12)

AN90576: (A β 3-9/toxóide de tétano 830-844 numa configuração MAP4): EFRHDSGQYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 13)

Péptido descrito no documento US 5 736 142 (os quais estão em configurações lineares):

AN90562 (A β 1-7/péptido) AKXVAAWTLKAAADAEFRHD (SEQ ID NO: 14)

AN90543 (A β 1-7x3/péptido):

DAEFRHDDAEFRHDDAEFRHDAKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 15)

Como outros exemplos de proteínas de fusão (epítipo imunogénico de A β a negrito) refere-se

AKXVAAWTLKAAA-**DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD** (SEQ ID NO: 16)

DAEFRHD-AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 17)

DAEFRHD-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 18)

FRHDSGY-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 19)

EFRHDSG-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 20)

PKYVKQNTLKLAT-**DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD** (SEQ ID NO: 21)

DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-**DAEFRHD** (SEQ ID NO: 22)

DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO: 23)

DAEFRHD-DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT (SEQ ID NO: 24)

DAEFRHD-PKYVKQNTLKLAT-EKKLAKMEKASSVFNV-
 QYIKANSKFIGITEL-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-DAEFRHD
 DAEFRHD-DAEFRHD-DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL-
 FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID

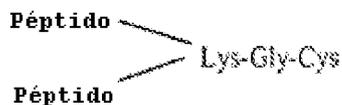
NO: 25)

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 26)

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-
 DAEFRHD

(SEQ ID NO: 27)

DAEFRHD-QYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO: 28) numa resina com 2 ramificações



EQVTNVGGAISQAVHAAHAEINEAGR (proteína de fusão de sinucleína numa configuração MAP-4; SEQ ID NO: 29).

É possível utilizar os mesmos, ou semelhantes, veículos proteicos e métodos de ligação para gerar imunogénios utilizáveis na criação de anticorpos contra A β para a utilização na imunização passiva. Por exemplo, é possível administrar A β ou um fragmento ligado a um veículo a um animal de laboratório para a produção de anticorpos monoclonais para A β .

6. Agentes terapêuticos que codificam ácido nucleico

As respostas imunes contra depósitos amilóides também podem ser induzidas por meio da administração de ácidos nucleicos que codificam imunogénios peptídicos seleccionados ou anticorpos e as suas cadeia de componentes utilizadas para imunização passiva. Tais ácidos nucleicos podem ser ADN ou ARN. Um segmento de ácido nucleico que codifique um imunogénio encontra-se tipicamente ligado a elementos reguladores, tais como um promotor ou um

potenciador, que permitem a expressão do segmento de ADN nas células alvo pretendidas de um paciente. Para a expressão em células sanguíneas, conforme é desejável para a indução de uma resposta imune, são adequados para a expressão directa elementos promotores e potenciadores provenientes de genes das cadeias pesada e leve de imunoglobulina ou o promotor e potenciador precoce intermediário principal de CMV. Os elementos reguladores ligados e as sequências codificadoras são muitas vezes clonadas num vector. Para a administração de anticorpos de cadeia dupla, é possível clonar as duas cadeias no mesmo vector ou em vectores separados.

Encontram-se disponíveis diversos sistemas de vectores virais, incluindo sistemas retrovirais (ver, *v.g.*, Lawrie e Tumin, *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3, 102-109, 1993); vectores adenovirais (ver, *v.g.*, Bett *et al.*, *J. Virol.* 67, 5911, 1993); vectores de vírus adeno-associados (ver, *v.g.*, Zhou *et al.*, *J. Exp. Med.* 179, 1867, 1994), vectores virais provenientes da família da varíola, incluindo o vírus de vacínia e os vírus de varíola aviária, vectores virais provenientes do género α -vírus, tais como os obtidos a partir de vírus Sindbis e Semliki Forest (ver, *v.g.*, Dubensky *et al.*, *J. Virol.* 70, 508-519, 1996), vírus de encefalite equina venezuelana (ver o documento US 5 643 576) e rabdo-vírus, tais como o vírus de estomatite vesicular (ver o documento WO 96/34625) e vírus do papiloma (Ohe *et al.*, *Human Gene Therapy* 6, 325-333, 1995); Woo *et al.*, WO 94/12629 e Xiao & Brandsma, *Nucleic Acids. Res.* 24, 2630-2622, 1996).

O ADN que codifica um imunogénio, ou um vector que contém o mesmo, pode ser embalado em lipossomas. Como

lípidos adequados e análogos associados refere-se os descritos nos documentos US 5 208 036, 5 264 618, 5 279 833 e 5 283 185. OS vectores e o ADN que codificam um imunogénio também podem ser adsorvidos em veículos particulados ou estarem associados a estes, cujos exemplos compreendem polímeros de polimetil-metacrilato e polilactidas e poli(lactida-co-glicólidos), ver, v.g., McGee et al., J. Micro Encap. (1996).

Os vectores de terapia de genes ou o ADN desguarnecido podem ser administrados *in vivo* por meio da administração a um paciente individual, tipicamente por administração sistémica (v.g., intravenosa, intraperitoneal, intranasal, gástrica, intradérmica, intramuscular, subdérmica ou infusão intracraniana) ou por aplicação tópica (ver, v.g., o documento US 5 399 346). Tais vectores podem ainda incluir agentes facilitadores, tais como bupivacaína (documento US 5 593 970). O ADN também pode ser administrado utilizando uma pistola de genes. Veja-se Xiao & Brandsma, *supra*. O ADN que codifica um imunogénio é precipitado sobre uma superfície de gotas metálicas microscópicas. Os microprojecteis são acelerados com uma onda de choque ou por expansão de hélio gasoso e penetram nos tecidos a uma profundidade de diversas camadas. Por exemplo, é adequada a utilização do dispositivo de administração de genes Accel™ produzido por Agracetus, Inc., (Middleton, WI). Em alternativa, o ADN desguarnecido pode passar através da pele para a corrente sanguínea simplesmente por aplicação do ADN sobre a pele com irritação química ou mecânica (veja-se o documento WO 95/05853).

De acordo com outras variantes, os vectores que codificam imunogénios podem ser administrados *ex vivo* a células, tais como células removidas de um paciente individual (v.g., linfócitos, aspirados de medula óssea, tecidos de biópsia) ou células estaminais hematopoiéticas de dadores universais, seguindo-se a re-implantação das células no paciente, normalmente após selecção das células que possuem o vector incorporado.

7. Pesquisa de anticorpos para actividade de limpeza

O exemplo XIV descreve métodos para a pesquisa de um anticorpo para a actividade de limpeza de um depósito amilóide. Para a pesquisa de actividade contra um depósito amilóide, faz-se contactar uma amostra de tecido proveniente de um paciente com amiloidose, tal como um tecido cerebral na doença de Alzheimer, ou um modelo animal que possui uma patologia amilóide característica com células fagocíticas que suportam um receptor Fc, tais como células microgliais, e com o anticorpo que se pretende ensaiar num meio *in vitro*. As células fagocíticas podem ser uma cultura primária ou uma linhagem de células, tais como BV-2, C8-B4 ou THP-1. Estes componentes são combinados lâmina de microscópio para facilitar a monitorização microscópica, ou então podem ser efectuadas múltiplas reacções em paralelo nas cavidades de uma placa de microtitulação. Nesse formato, é possível montar em separado uma lâmina de microscópio em miniatura em cavidades separadas, ou num formato de detecção não microscópico, tal como ELISA, é possível utilizar a detecção de A β . De preferência, são efectuadas diversas medições da quantidade de depósito amilóide na mistura de

reacção *in vitro*, a partir de um valor da linha de base antes do início da reacção e um ou mais valores de ensaio durante a reacção. O antigénio pode ser detectado por análise de manchas, por exemplo, com um anticorpo marcado de um modo fluorescente para A β ou para outros componentes das placas amilóides. O anticorpo utilizado para manchar pode ser ou não o mesmo anticorpo que se está a estudar quanto à actividade de limpeza. Uma redução em relação à linha de base durante a reacção dos depósitos amilóides indica que o anticorpo em teste possui uma actividade de limpeza. Tais anticorpos são provavelmente úteis para a prevenção ou para o tratamento de Alzheimer ou de outras doenças amiloidogénicas. Conforme descrito antes, as experiências efectuadas para apoiar a presente invenção revelaram, utilizando um tal ensaio, que os anticorpos para o fragmento NAC de sinucleína são eficazes para limpar as placas amilóides características da doença de Alzheimer.

D. Pacientes susceptíveis a regimes de tratamento anti-amilóide

Os pacientes susceptíveis a tratamento compreendem indivíduos em risco de doença mas que não apresentem sintomas, bem como pacientes que apresentam sintomas de amiloidose. No caso da doença de Alzheimer, praticamente qualquer pessoa está em risco de padecer da doença de Alzheimer, caso viva durante um período suficientemente longo. Assim, os métodos presentes podem ser administrados profilacticamente à população geral sem qualquer avaliação de risco para o sujeito paciente. Os métodos da presente invenção são particularmente úteis para indivíduos que possuem um risco genético conhecido de doença de Alzheimer

ou de quaisquer outras doenças amilóides hereditárias. Tais indivíduos compreendem aqueles que possuam familiares que tenham sofrido esta doença e aqueles cujo risco é determinado por meio de uma análise de marcadores genéticos ou bioquímicos. Os marcadores genéticos de risco da doença de Alzheimer compreendem as mutações do gene APP, em particular as mutações na posição 717 e nas posições 670 e 671, designadas respectivamente por mutações de Hardy e sueca (ver, Hardy, TINS, *supra*). Como outros marcadores de risco refere-se as mutações nos genes de presenilina, PS1 e PS2, e ApoE4, história familiar de DA, hipercolesterolemia ou aterosclerose. Os indivíduos que já padecem da doença de Alzheimer podem ser reconhecidos a partir de demência característica, bem como pela presença dos factores de risco descritos antes. Além disso, encontram-se disponíveis diversos testes de diagnóstico para a identificação de indivíduos que sofrem de DA. Estes incluem determinações dos níveis de CSF tau e de A β 42. Níveis elevados de tau e reduzidos de A β 42 indicam a presença da DA. Indivíduos que sofrem da doença de Alzheimer também podem ser diagnosticados por critérios MMSE ou ADRDA, conforme descrito na secção dos exemplos.

Em pacientes assintomáticos, o tratamento pode ter início em qualquer idade (*v.g.*, 10, 20, 30). No entanto, não é necessário normalmente iniciar o tratamento até que o paciente atinja os 40, 50, 60 ou 70. Tipicamente, o tratamento compreende dosagens múltiplas ao longo de um período de tempo. O tratamento pode ser monitorizado por testes ao anticorpo ou a respostas de células T ou células B activadas ao agente terapêutico (*v.g.*, péptido A β), ao longo do tempo, de acordo com as linhas gerais aqui

descritas nos exemplos I e II. No caso de a resposta diminuir, então é indicada uma dosagem de reforço. No caso de pacientes potenciais da síndrome de Down, o tratamento pode ter início pré-natal por meio da administração do agente terapêutico à mãe ou pouco tempo após o nascimento.

Há outras formas de amiloidose que são muitas vezes não diagnosticadas, salvo quando se suspeita de uma propensão particular para a doença. Um sintoma principal é a presença de uma doença cardíaca ou renal em pacientes de meia-idade ou idosos que também apresentem sinais de envolvimento de um outro órgão. Uma voltagem reduzida ou desvios extremos do eixo no electrocardiograma e tecido ventricular mais espesso também são indicadores de um envolvimento cardíaco. A proteinúria é um sintoma do envolvimento renal. O envolvimento hepático também pode ser suspeitado, no caso de se detectar hepatomegalia por meio de um exame físico ao paciente. A neuropatia periférica também constitui uma ocorrência comum de determinadas formas de amiloidose; também podendo ser encontradas em neuropatia autonómica, caracterizada por hipotensão postural. Deverá suspeitar-se de amiloidose em qualquer pessoa com uma neuropatia progressiva de origem indeterminada. Um diagnóstico definitivo da doença pode ser efectuado utilizando métodos de biópsia de tecido, quando o órgão afectado se encontra disponível. Para amiloidoses sistémicas, é possível utilizar camadas de gordura aspiradas ou amostras rectais para biópsia. O material de biópsia é manchado com vermelho do Congo, em que as amostras positivas exibem uma birrefringência verde maçã sob luz polarizada, ao microscópio.

E. Regimes de tratamento

Para aplicações profiláticas, as composições farmacêuticas ou medicamentos são administrados a um paciente susceptível a, ou em risco de, uma doença particular numa quantidade suficiente para eliminar ou reduzir o risco ou para atrasar o início da doença. Para aplicações terapêuticas, as composições ou medicamentos são administrados a um paciente que se suspeite que sofra, ou que já sofra de uma tal doença numa quantidade suficiente para curar, ou pelo menos parar, os sintomas da doença e das suas complicações. Uma quantidade adequada para conseguir tal fim é definida com um dose terapêutica ou farmacêuticamente eficaz. Nos regimes profilático ou terapêutico, os agentes são normalmente administrados em diversas dosagens até se alcançar uma resposta imune suficiente. Tipicamente, a resposta imune é monitorizada e são administradas doses repetidas no caso da resposta imune começar a diminuir.

As doses eficazes das composições da presente invenção para o tratamento das patologias descritas antes variam em função de muitos factores diferentes, tais como o modo de administração, o local alvo, o estado fisiológico do paciente, se o paciente é um ser humano ou um animal, outras medicações administradas e se o tratamento é profilático ou terapêutico. Normalmente, o paciente é um ser humano, mas em algumas doenças, tais como a doença das vacas loucas associada à proteína do prião, o paciente possa ser um mamífero não humano, tal como um bovino. As dosagens de tratamento precisam de ser tituladas para se otimizar a segurança e a eficácia. A quantidade de imunogénio depende se também é administrado um adjuvante,

sendo normalmente necessárias dosagens mais elevadas na ausência do adjuvante. Em função da imunogenicidade da formulação particular, uma quantidade de um imunogénio para administração pode estar compreendida entre 1 µg e 500 µg por paciente e mais usualmente entre 5 µg e 500 µg por injeção para a administração a seres humanos. Ocasionalmente, é utilizada uma dose superior compreendida entre 0,5 mg e 5 mg por injeção. Tipicamente, é utilizada pelo menos cerca de 10, 20, 50 ou 100 µg para cada injeção a seres humanos. O intervalo das injeções pode variar significativamente desde uma vez ao dia, até uma vez ao ano, uma vez por década, sendo preferidos “reforços” sucessivos de imunogénio. De um modo geral, de acordo com os ensinamentos aqui descritos, as dosagens eficazes podem ser monitorizadas por meio da obtenção de uma amostra de fluido do paciente, geralmente de uma amostra de soro de sangue, e determinação do título de anticorpo desenvolvido contra o imunogénio, utilizando métodos bem conhecidos na especialidade e facilmente adaptáveis ao antigénio específico que se pretende determinar. De um modo ideal, é recolhida uma amostra antes do início da administração da dose; sendo recolhidas amostras subsequentes e tituladas após cada imunização. De um modo geral, é desejável uma dose ou regime de dosagem que proporcione um título detectável pelo menos quatro vezes superior em relação ao nível de controlo ou de fundo, para uma diluição de soro de 1:100, em que o fundo é definido em relação a um soro de controlo ou em relação a um fundo de placa em ensaios ELISA. De acordo com a presente invenção, são preferidos títulos pelo menos de 1:1000 ou 1:5000.

Para um dia qualquer em que uma dosagem de imunogénio é administrada, a dosagem é normalmente superior a 1 µg/paciente e preferencialmente superior a 10 µg/paciente, caso também seja administrado o adjuvante, e pelo menos superior a 10 µg/paciente e normalmente superior a 100 µg/paciente, na ausência de adjuvante. As doses para imunogénios individuais, seleccionadas de acordo com a presente invenção, são determinadas de acordo com métodos de dosagem e de titulação convencionais, considerados em conjunto com os ensinamentos aqui descritos. Um regime típico consiste numa imunização seguida de injeções de reforço em intervalos de tempo, tais como em intervalos de 6 semanas. Um outro regime consiste numa imunização seguida por injeções de reforço após 1, 2 e 12 meses. Um outro regime compreende uma injeção em cada dois meses durante a vida. Em alternativa, as injeções de reforço podem ser administradas numa base irregular conforme indicado pela monitorização da resposta imune.

Para a imunização passiva com um anticorpo, as dosagens estão compreendidas entre cerca de 0,0001 e 100 mg/kg e mais normalmente entre 0,01 e 5 mg/kg do peso corporal do hospedeiro. Por exemplo, as dosagens podem ser de 1 mg/kg de peso corporal ou de 10 mg/kg de peso corporal. Um regime de tratamento exemplificativo compreende a administração, uma vez a cada duas semanas ou uma vez por mês ou uma vez a cada 3 a 6 meses. De acordo com alguns métodos, são administrados em simultâneo dois ou mais anticorpos monoclonais com especificidades de ligação diferentes, caso este em que a dosagem para cada anticorpo administrado está compreendida nos intervalos indicados. O anticorpo é normalmente administrado em múltiplas ocasiões. Os

intervalos entre doses individuais podem ser semanais, mensais ou anuais. Os intervalos também podem ser irregulares conforme indicado pela determinação dos níveis no sangue de anticorpo para A β no paciente. Em alternativa, o anticorpo pode ser administrado como uma formulação de libertação prolongada, caso este em que é necessária uma frequência inferior de administração. A dosagem e a frequência variam em função do período de semi-vida do anticorpo no paciente. De um modo geral, os anticorpos humanos apresentam o período de semi-vida mais longo, seguindo-se os anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos e anticorpos não humanos. A dosagem e a frequência de administração podem variar em função do tratamento ser profiláctico ou terapêutico. Para aplicações profilácticas, é administrada uma dosagem relativamente baixa em intervalos relativamente infrequentes durante um período de tempo longo. Alguns pacientes continuam a receber tratamento para o resto das suas vidas. Para aplicações terapêuticas, são por vezes necessárias dosagens relativamente elevadas em intervalos relativamente curtos até se reduzir ou terminar a progressão da doença e preferencialmente até o paciente apresentar melhorias parciais ou completas dos sintomas da doença. Depois, pode ser administrado ao paciente um regime profiláctico.

As doses de ácidos nucleicos que codificam imunogénios estão compreendidas entre cerca de 10 ng e 1 g, 100 ng e 100 mg, 1 μ g e 10 mg ou 30 μ g e 300 μ g de ADN por paciente. As doses de vectores virais infecciosos estão compreendidas entre 10 e 100 ou mais virões por dose.

Os agentes para a indução de uma resposta imune podem ser administrados por via parentérica, tópica, intravenosa,

oral, subcutânea, intraperitoneal, intranasal ou intramuscular para o tratamento profilático ou terapêutico. Como vias de administração típicas de um agente imunogénico refere-se as vias intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.) ou subcutânea (s.c.), embora outras vias também possam ser igualmente eficazes. Tipicamente, a injeção intramuscular é administrada nos músculos do braço ou da perna. De acordo com alguns métodos, os agentes são injectados directamente num tecido particular onde os depósitos se acumularam, por exemplo, injeção intracraniana. A injeção intramuscular ou a infusão intravenosa são as formas preferidas de administração do anticorpo. De acordo com alguns métodos, os anticorpos terapêuticos particulares são injectados directamente no crânio. De acordo com alguns métodos, os anticorpos são administrados sob a forma de uma composição ou dispositivo de libertação prolongada, tal como um dispositivo Medipad™.

Os agentes da invenção podem ser facultativamente administrados em combinação com outros agentes que sejam pelo menos parcialmente eficazes para o tratamento de doenças amiloidogénicas. No caso da doença de Alzheimer e da síndrome de Down, nas quais os depósitos amilóides têm lugar no cérebro, os agentes da invenção também podem ser administrados em conjunto com outros agentes que aumentem a passagem dos agentes da invenção através da barreira hemato-encefálica. Além disso, a invenção também contempla misturas terapêuticas que compreendem imunogénios concebidos para provocar uma resposta imune contra mais do que um componente amilóide, tal como estão contempladas combinações de um anticorpo dirigido contra um componente

da placa e um imunogénio dirigido a um componente da placa diferente.

Os agentes imunogénicos da invenção, tais como péptidos, são administrados em combinação com um adjuvante. É possível utilizar diversos adjuvantes em combinação com um péptido, tal como A β , para proporcionar uma resposta imune. Os adjuvantes preferidos aumentam a resposta intrínseca a um imunogénio sem provocar alterações conformacionais no imunogénico que afectem a forma qualitativa da resposta. Como adjuvantes preferidos refere-se hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio, lípido A de monofosforilo 3 De-O-acetilado (MPL) (veja-se o documento GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, agora fazendo parte de Corixa). O Stimulon™ QS-21 é um glicósido ou saponina de triterpeno isolado a partir da casca da árvore-do-sabão encontrada na América do Sul (veja-se Kensil et al., na obra *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); patente de invenção norte-americana nº 5 057 540), (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA). Como outros adjuvantes refere-se emulsões de óleo-em-água (tais como esqualeno ou óleo de amendoim), facultativamente em combinação com estimulantes imunes, tais como lípido A de monofosforilo (veja-se Stoute et al., *N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1997)). Um outro adjuvante é CpG (documento WO 98/40100). Em alternativa, é possível acoplar A β a um adjuvante. No entanto, tal acoplamento não deverá alterar substancialmente a configuração A β para não afectar a natureza da resposta imune a A β . Os adjuvantes podem ser administrados como um componente da composição terapêutica com um agente activo ou podem ser administrados em

separado, antes, em simultâneo ou após a administração do agente terapêutico.

Uma classe preferida de adjuvantes são os sais de alumínio (alum), tais como hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio, sulfato de alumínio. Tais adjuvantes podem ser utilizados em conjunto ou na ausência de outros agentes imuno-estimuladores específicos, tais como MPL ou 3-DMP, QS-21, aminoácidos poliméricos ou monoméricos, tais como ácido poliglutâmico ou polilisina. Uma outra classe de adjuvantes são as formulações em emulsões de óleo-em-água. Tais adjuvantes podem ser utilizados em conjunto ou na ausência de outros agentes imuno-estimuladores específicos, tais como péptidos de muramilo (v.g., N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetilnormuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-di-palmitoíl-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxi-propilamida (DTP-DPP), teramida™ ou outros componentes da parede celular de bactérias. As emulsões óleo-em-água compreendem (a) MF59 (WO 90/14837), que contém 5% de esqualeno, 0,5% de Tween 80 e 0,5% de Span 85 (facultativamente contendo diversas quantidades de MTP-PE), formulado em partículas sub-mícron utilizando um microfluidificador, tal como o microfluidificador de modelo 110 Y (Microfluidics, Newton MA), (b) SAF, contendo 10% de esqualeno, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero L121 bloqueado com plurónico e thr-MDP, microfluidificado numa emulsão sub-mícron ou centrifugado para se obter uma emulsão de partículas com um tamanho superior, e (c) sistema adjuvante Ribit™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT), que contém 2%

de esqualeno, 0,2% de Tween 80 e um ou vários componentes da parede celular de bactérias seleccionado entre o conjunto constituído por lípido A monofosforilo, dimicolato de tre-halose (TDM) e estrutura principal da parede celular (CWS) e preferencialmente MPL + CWS (Detox™). Uma outra classe de adjuvantes preferidos são os adjuvantes de saponina, tais como Stimulon™ (QS-21; Aquila, Framingham, MA) ou partículas geradas a partir dele, tais como ISCOM (complexos imuno-estimuladores) e ISCOMATRIX. Como outros adjuvantes refere-se adjuvante incompleto de Freund (IFA), citocinas, tais como interleucinas (IL-1, IL-2 e IL-12), factor estimulador da colónia de macrófagos (M-CSF) e factor de necrose tumoral (TNF).

O imunogénio e o adjuvante podem ser embalados e fornecidos no mesmo recipiente ou podem ser embalados em recipientes separados, sendo misturados antes da utilização. Tipicamente, o imunogénio e o adjuvante são embalados com uma marca que indica a aplicação terapêutica pretendida. No caso de o imunogénio e o adjuvante serem embalados em separado, a embalagem inclui tipicamente instruções para a mistura antes da utilização. A escolha de um adjuvante e/ou veículo depende de factores, tais como a estabilidade da formulação que contém o adjuvante, a via de administração, o regime de dosagem e a eficácia do adjuvante para as espécies que se pretende vacinar. Em seres humanos, um adjuvante farmacologicamente aceitável preferido é aquele que foi aprovado para administração a humanos pelas entidades reguladoras. Como exemplos de tais adjuvantes preferidos para seres humanos refere-se alum, MPL e QS-21. Facultativamente, é possível utilizar em simultâneo dois ou mais adjuvantes diferentes. Como

combinações preferidas refere-se alum com MPL, alum com QS-21, MPL com QS-21, e alum, QS-21 e MPL em conjunto. Também é possível utilizar o adjuvante incompleto de Freund (Chang *et al.*, *Advanced Drug Delivery Reviews* 32, 173-186 (1998)), facultativamente em combinação com alum, QS-21 ou MPL e todas as suas combinações.

Os agentes da invenção são muitas vezes administrados como composições farmacêuticas que compreendem um agente terapêuticamente activo e diversos outros componentes farmacêuticamente aceitáveis. Ver a obra Remington's *Pharmaceutical Science* (19^a ed., 1995). A forma preferida depende da via de administração e da aplicação terapêutica pretendidas. As composições também podem incluir, em função da formulação desejada, veículos ou diluentes não tóxicos farmacêuticamente aceitáveis, os quais são definidos como veículos normalmente utilizados para a formulação de composições farmacêuticas para administração a animais ou seres humanos. O diluente é seleccionado de um modo tal que não afecte a actividade biológica da combinação. Como exemplos de tais diluentes refere-se água destilada, soluto salino tamponado com fosfato fisiológico, solução de Ringer, solução de dextrose e solução de Hank. Além disso, a composição ou formulação farmacêutica também pode compreender outros veículos, adjuvantes ou estabilizadores não tóxicos, não terapêuticos, não imunogénicos e semelhantes.

As composições farmacêuticas também podem compreender macromoléculas compridas lentamente metabolizadas, tais como proteínas, polissacáridos, tais como quitosano, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos e copolímeros (tais como sefarose funcionalizada com látex, agarose, celulose e

semelhantes), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos e agregados de lípidos (tais como gotículas de óleo ou lipossomas). Além disso, estes veículos podem actuar como agentes imuno-estimuladores (isto é, adjuvantes).

Para a administração por via parentérica, os agentes da invenção podem ser administrados como dosagens injectáveis de um solução ou suspensão da substância num diluente fisiologicamente aceitável com um veículo farmacêutico que pode ser um líquido estéril, tal como água, óleos, soluto salino, glicerol ou etanol. Além do mais, também podem estar presentes nas composições substâncias suplementares, tais como agentes humectantes ou emulsionantes, tensioactivos, substâncias de tamponamento do pH e semelhantes. Como outros componentes das composições farmacêuticas refere-se os de origem do petróleo, animal, vegetal ou sintética, por exemplo, óleo de amendoim, óleo de soja e óleo mineral. De um modo geral, os glicóis, tais como propileno-glicol ou polietileno-glicol, são os veículos líquidos preferidos, em particular para soluções injectáveis. Os anticorpos podem ser administrados sob a forme de uma injeção de um depósito ou de uma preparação em implante, os quais podem ser formulados de um modo tal que permitam uma libertação prolongada do ingrediente activo. Uma composição exemplificativa compreende um anticorpo monoclonal com uma concentração de 5 mg/mL, formulado num tampão aquoso constituído por L-histidina 50 mM, NaCl 150 mM, ajustado para um valor de pH de 6,0 com HCl.

Tipicamente, as composições são preparadas como formulações injectáveis, quer como soluções quer como suspensões líquidas; também é possível preparar formas

sólidos adequadas para solução, ou suspensão, em veículos líquidos antes da injeção. A preparação também pode ser emulsionada ou encapsulada em lipossomas ou micropartículas, tais como poliláctido, poliglicolido ou copolímero, para aumentar o efeito adjuvante, conforme descrito antes (ver Langer, *Science* 249, 1527 (1990) e Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, 97-119 (1997)). Os agentes da presente invenção podem ser administrados sob a forma de uma injeção de depósito ou de uma preparação em implante, a qual podem ser formulada de um modo tal que permita uma libertação prolongada ou em pulsos do ingrediente activo.

Como formulações suplementares adequadas para outras vias de administração refere-se as formulações oral, intranasal e pulmonar, os supositórios e as aplicações transdérmicas.

Para os supositórios, como aglutinantes e veículos refere-se, por exemplo, polialquileno-glicóis ou triglicéridos; em que tais supositórios podem ser formados a partir de misturas que contêm o ingrediente activo numa quantidade compreendida entre 0,5% e 10% e de preferência entre 1% e 2%. As formulações orais compreendem excipientes, tais como manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina de sódio, celulose e carbonato de magnésio de qualidade farmacêutica. Estas formulações podem assumir a forma de soluções, suspensões, comprimidos, pílulas, cápsulas, formulações de libertação prolongada ou pós e contêm entre 10% e 95% de ingrediente activo e de preferência entre 25% e 70%.

A aplicação tópica pode proporcionar a administração transdérmica ou intradérmica. A administração por via

tópica pode ser facilitada pela co-administração de um agente com a toxina de cólera ou seus derivados desintoxicados ou suas subunidades ou com outras toxinas bacterianas semelhantes (veja-se Glenn *et al.*, *Nature* 391, 851 (1998)). A co-administração pode ser efectuada utilizando os componentes como uma mistura ou como moléculas ligadas obtidas por reticulação química ou expressão sob a forma de uma proteína de fusão.

Em alternativa, a administração transdérmica pode ser alcançada utilizando um adesivo para a pele ou utilizando transferossomas (Paul *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 25, 3521-24 (1995); Cevc *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta* 1368, 201-15 (1998)).

F. Métodos de diagnóstico

A invenção proporciona métodos para a detecção de uma resposta imune contra o péptido A β num paciente que sofre ou que é susceptível à doença de Alzheimer, de acordo com a reivindicação 10. Os métodos são particularmente úteis para a monitorização do decurso do tratamento que se está a administrar ao paciente. Os métodos podem ser utilizados para monitorizar o tratamento terapêutico em pacientes sintomáticos e o tratamento profiláctico em pacientes assintomáticos. Os métodos são úteis para a monitorização de imunização activa (*v.g.*, anticorpo produzido como resposta à administração de imunogénio) e de imunização passiva (*v.g.*, determinação do nível de anticorpo administrado).

1. Imunização activa

Alguns métodos compreendem a determinação de uma linha de base de uma resposta imune num paciente antes da administração de uma dosagem do agente e subsequente comparação deste valor com um valor para a resposta imune após o tratamento. Um aumento significativo (isto é, superior à margem típica do erro experimental em medições repetidas com a mesma amostra, expressa como o desvio padrão a partir da média de tais medições) no valor da resposta imune significa um resultado positivo do tratamento (isto é, a administração do agente atingiu ou aumentou uma resposta imune). No caso de o valor para a resposta imune não se alterar significativamente ou diminuir, então isso significa um resultado negativo do tratamento. De um modo geral, prevê-se que os pacientes submetidos a um tratamento inicial com um agente imunogénico apresentem um aumento na resposta imune através de dosagens sucessivas, até se atingir eventualmente um patamar. De um modo geral, mantém-se a administração do agente enquanto a resposta imune aumentar. O alcançar de um patamar constitui um indicador de que é possível descontinuar ou reduzir a dosagem ou a frequência do tratamento administrado.

De acordo com outros métodos, determina-se um valor de controlo (isto é, a média e o desvio padrão) da resposta imune para uma população de controlo. Tipicamente, os indivíduos na população de controlo ainda não receberam tratamento anterior. Os valores determinados da resposta imune num paciente após a administração de um agente terapêutico são então comparados com o valor de controlo. Um aumento significativo em relação ao valor de controlo

(v.g., superior ao desvio padrão mais a média) indica um resultado positivo do tratamento. A ausência de um aumento significativo ou uma diminuição indica um resultado negativo do tratamento. De um modo geral, mantém-se a administração do agente enquanto a resposta imune estiver a aumentar em relação ao valor de controlo. Tal como anteriormente, a obtenção de um patamar em relação aos valores de controlo constitui um indicador de que é possível descontinuar ou reduzir a dosagem ou a frequência de administração do tratamento.

De acordo com outros métodos, determina-se um valor de controlo da resposta imune (v.g., média e desvio padrão) a partir de uma população de controlo de indivíduos que foram já submetidos a tratamento com um agente terapêutico e cujas respostas imunes atingiram um patamar em resposta ao tratamento. Os valores medidos da resposta imune de um paciente são comparados com o valor de controlo. No caso de o nível medido não ser significativamente diferente (v.g., superior ao desvio padrão mais a média) do valor de controlo, então o tratamento pode ser descontinuado. No caso do nível num paciente ser significativamente inferior ao valor de controlo, então é garantida a continuação da administração do tratamento. No caso de o nível num paciente persistir abaixo do valor de controlo, então deverá ser efectuada uma alteração no regime, por exemplo, pode ser indicada a utilização de um adjuvante diferente.

De acordo com outros métodos, um paciente que não esteja a receber tratamento, no momento presente, mas que tenha sido submetido a um tratamento anterior é monitorizado quanto a uma resposta imune para se determinar se é necessário o recomeço do tratamento. O valor medido de

resposta imune no paciente pode ser comparado com um valor de resposta imune anteriormente atingido pelo paciente no decorrer do tratamento anterior. Uma diminuição significativa em relação a medições anteriores (isto é, superior a uma margem de erro típica para medições repetidas para a mesma amostra) indica que o tratamento deverá ser recomeçado. Em alternativa, o valor medido pode ser comparado com um valor de controlo (média mais desvio padrão), determinado numa população de pacientes após serem submetidos ao tratamento. Em alternativa, o valor medido num paciente pode ser comparado com um valor de controlo em populações tratadas profilacticamente que permaneceram livres de sintomas da doença ou em populações de pacientes tratados terapeuticamente que apresentaram melhorias das características da doença. Em todos estes casos, uma diminuição significativa em relação ao nível de controlo (isto é, superior ao desvio padrão) indica que o tratamento deve ser recomeçado no paciente.

Tipicamente, a amostra de tecido para análise é o sangue, o plasma, o soro, a mucosa ou o fluido cerebrospinal do paciente. A amostra é analisada quanto à indicação de uma resposta imune ao componente amilóide relevante, tal como qualquer forma do péptido A β . A resposta imune pode ser determinada na presença, *v.g.*, de anticorpos ou de células T que se liguem especificamente ao componente relevante, tal como o péptido A β . Os métodos ELISA para a detecção de anticorpos específicos para A β encontram-se descritos na secção dos exemplos e podem ser aplicados a outros antigénios peptídicos. Os métodos para a detecção de células T reactivas são bem conhecidos na especialidade.

2. Imunização passiva

De um modo geral, os procedimentos para monitorizar a imunização passiva são idênticos aos utilizados para monitorizar a imunização activa, descritos antes. No entanto, o perfil do anticorpo após imunização passiva demonstra tipicamente um pico imediato na concentração de anticorpo seguida por uma queda exponencial. Na ausência de outra dosagem, a queda aproxima-se dos níveis pré-tratamento num período desde dias a meses, em função do período de semi-vida do anticorpo administrado. Por exemplo, o período de semi-vida de alguns anticorpos humanos é da ordem de 20 dias.

De acordo com alguns métodos, efectua-se a medição de uma linha de base do anticorpo para A β no paciente antes de se efectuar a administração, efectua-se uma segunda medição num tempo relativamente curto para se determinar o nível de anticorpo no pico e efectua-se um ou várias medições em intervalos de tempo para monitorizar a queda dos níveis de anticorpo. Quando o nível de anticorpo decresce até à linha base ou até uma percentagem predeterminada do pico menos a linha base (v.g., 50%, 20% ou 10%), efectua-se a administração de uma outra dosagem do anticorpo. De acordo com alguns métodos, efectua-se a comparação dos níveis do pico ou de medições subsequentes menos o valor de fundo com níveis de referência previamente determinados para se constituir um regime de tratamento profiláctico ou terapêutico benéfico em outros pacientes. No caso de o nível de anticorpo medido ser significativamente inferior em relação ao nível de referência (v.g., inferior à média menos o desvio padrão do valor de referência para uma população de pacientes que beneficiou do tratamento), então

é indicada a administração de uma dosagem suplementar de anticorpo.

3. Estojos de diagnóstico

São descritos estojos de diagnóstico para a realização dos métodos de diagnóstico descritos antes. Tipicamente, tais estojos contêm um agente que se liga especificamente aos anticorpos para um componente de placa amilóide, tal como A β , ou que reage com células T específicas para o componente. O estojo também inclui um marcador. Para a detecção de anticorpos para A β , o marcador está tipicamente sob a forma de anticorpos anti-idiotípicos marcados. Para a detecção de anticorpos, o agente pode ser fornecido pré-ligado a uma fase sólida, tal como as cavidades de uma placa de microtitulação. Para a detecção de células T reactivas, o marcador pode ser fornecido como 3H-timidina para se medir uma resposta proliferativa. Os estojos também contêm tipicamente instruções sob a forma de utilização do estojo. As instruções também podem incluir um gráfico ou outro regime de correspondência que correlacione os níveis de marcador medidos com os níveis de anticorpos para A β ou de células T reactivas com A β . O termo instruções designa qualquer material escrito ou gravado que esteja ligado ao estojo, ou que o acompanhe, em qualquer momento durante o seu fabrico, transporte, venda ou utilização. Por exemplo, o termo instruções compreender os panfletos e as brochuras de aviso, os materiais de embalagem, as instruções, cassetes de vídeo ou áudio, discos para computador, bem como escritos impressos directamente nos estojos.

EXEMPLOS

I. EFICÁCIA PROFILÁCTICA DE A β CONTRA A DOENÇA DE ALZHEIMER (DA)

Estes exemplos descrevem a administração de péptido A β ₄₂ a murganhos transgénicos que sobreexpressam APP com uma mutação na posição 717 (APP_{717V→F}), a qual os predispõe a desenvolver uma neuropatia do tipo Alzheimer. A produção e as características destes murganhos (murganhos PDAPP) encontra-se descrita por Games *et al.*, *Nature*, *supra*. Estes animais, na sua forma heterozigótica, começam a depositar A β a partir dos seis meses de idade. Aos quinze meses de idade, exibem níveis de deposição de A β equivalentes aos verificados para a doença de Alzheimer. Os murganhos PDAPP forma injectados com agregados de A β ₄₂ (agregados de A β ₄₂) ou com soluto salino tamponando com fosfato. Seleccionou-se agregados de A β ₄₂ devido à sua aptidão para induzir anticorpos para múltiplos epítomos de A β .

A. MÉTODOS

1. Fonte de murganhos

Trinta murganhos heterogénicos PDAPP fêmeas foram divididos aleatoriamente nos grupos seguintes: 10 murganhos para injeção com agregados de A β ₄₂ (um morreu no decurso), 5 murganhos injectados com PBS/adjuvante ou PBS e 10 murganhos de controlo não injectados. Cinco murganhos foram injectados com péptidos provenientes da sequência da proteína amilóide do soro (SAP).

2. Preparação de imunogénios

Preparação de agregados de A β 42: dissolveu-se dois miligramas de A β 42 (US Peptides Inc, lote K-42-12) em 0,9 mL de água e perfez-se até 1 mL por adição de 0,1 mL de 10 x PBS. Centrifugou-se esta mistura e manteve-se a incubar de um dia para o outro a 37°C, sob condições para o péptido se agregar. Armazenou-se o A β não utilizado sob a forma de um pó liofilizado a -20°C até à próxima injeção.

Faz-se observar que no caso de se utilizar péptidos comercialmente disponíveis, os pesos anidros podem incluir pesos de sal; os pesos aqui reportados para todos os exemplos, salvo quando indicado de outro modo, incluem os pesos de sal. As massas exactas do péptido podem ser determinadas por meio da utilização de ensaios convencionais de preparação, tais como determinação com azoto, em conjunto com a composição conhecida.

3. Preparação de injeções

Para cada injeção, preparou-se uma emulsão a 1:1 de 100 μ g de A β 42 agregado em PBS por murganho emulsionou-se com adjuvante completo de Freund (CFA), num volume final de emulsão de 400 μ L para a primeira emulsão, seguindo-se um reforço com a mesma quantidade de imunogénio em adjuvante incompleto de Freund (IFA) às 2 semanas. Foram administradas duas doses suplementares de IFA em intervalos mensais. As imunizações subsequentes foram efectuadas em intervalos mensais em 500 μ L de PBS. As injeções foram administradas por via intraperitoneal (i.p.).

As injeções de PBS foram administradas no mesmo regime e os murganhos foram injectados com uma mistura a 1:1 de PBS/adjuvante, com 400 μ L por murganho, ou com 500

μ L de PBS por murgancho. As injeções de SAP também foram administradas com o mesmo regime utilizando uma dose de 100 μ g por injeção.

4. Titulação do sangramento de murganchos, preparação de tecidos e imuno-histoquímica

Os métodos anteriores encontram-se descritos *infra* na secção Materiais gerais e métodos.

B. Resultados

Injectou-se murganchos PDAPP com A β 42 agregado (agregado de A β 42), péptidos SAP ou soluto salino tamponado com fosfato. Um grupo de murganchos PDAPP também foi mantido sem injeção, controlos positivos. Os títulos dos murganchos de A β 42 agregado foram monitorizados a cada mês a partir do quarto reforço até os murganchos atingirem um ano de idade. Sacrificou-se os murganchos aos 13 meses de idade. Em todos os momentos examinados, oito dos nove murganchos com A β 42 agregado desenvolveram um elevado título de anticorpo, o qual se manteve elevado ao longo do conjunto de injeções (títulos superiores a 1/10000). O nono murgancho apresentou um título baixo, mas mensurável, aproximadamente de 1/1000 (Fig. 1, quadro 3). Os murganchos injectados com SAPP apresentaram títulos compreendidos entre 1:1000 e 1:30000 para este imunogénio, tendo apenas um murgancho excedido 1:10000.

QUADRO 3A

Títulos para 50% de D.O. máxima									
Murganhos injectados com AB agregado									
Idade de PDAPP (meses)	nº 100	nº 101	nº 102	nº 103	nº 104	nº 105	nº 106	nº 107	nº 108
4	70000	150000	15000	120000	1000	15000	50000	60000	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

QUADRO 3B

Títulos para 50% de D.O. máxima					
Murganhos injectados com PBS, com ambos os imunogénios a 1/100					
Idade de PDAPP (meses)	nº 113	nº 114	nº 115	nº 116	nº 117
6	<4 x bkg				
10	5 x bkg	<4 x bkg	<4 x bkg	<4 x bkg	<4 x bkg
12	<4 x bkg				

Titulou-se soro de murganhos tratados com PBS contra A β 42 decorridos seis, dez e doze meses. Para uma diluição de 1/100, os murganhos PBS, quando titulados contra A β 42 agregado, apenas excederam 4 vezes os valores de fundo para um valor de dados, sendo inferiores a 4 vezes o valor de fundo para todos os instantes de tempo (quadro 3). A resposta específica de SAP não foi significativa nestes instantes de tempo, tendo todos os títulos inferiores a 300.

Sete dos nove murganhos do grupo tratado com A β 1-42 agregado não apresentaram amilóide detectável no cérebro. Pelo contrário, o tecido cerebral proveniente de murganhos dos grupos SAP e PBS apresentavam diversos depósitos amilóides no hipocampo, bem como nos córtex frontal e

cingulado. O padrão de deposição foi idêntico ao dos controlos não tratados, com o envolvimento característico de subregiões vulneráveis, tais como a camada molecular exterior do giro dentado do hipocampo. Um murganho do grupo injectado com A β 1-42 apresentou uma carga amilóide bastante reduzida, confinada ao hipocampo. Também foi identificada uma placa isolada num outro murganho tratado com A β 1-42.

As análises quantitativas de imagens da carga amilóide no hipocampo demonstraram a redução dramática alcançada nos animais tratados com A β 42 (AN1792) (fig. 2). Os valores médios da carga amilóide para o grupo de PBS (2,22%) e para o grupo de controlo não tratado (2,65%) foram significativamente superiores aos valores dos imunizados com AN1792 (0,00%, $p = 0,0005$). Pelo contrário, o valor médio para o grupo imunizado com péptidos SAP foi de 5,74%. Tecido cerebral proveniente de murganhos de controlo não tratados continha diversos depósitos amilóides de A β , visualizados com o anticorpo monoclonal 3D6 específico de A β (mAb) no hipocampo, bem como no córtex retrosplenial. Também foi observado um padrão semelhante de deposição amilóide em murganhos imunizados com SAPP ou PBS (fig. 2). Além disso, para estes três últimos grupos verificou-se o envolvimento característico de subregiões vulneráveis do cérebro, observadas classicamente na DA, tais como a camada molecular exterior do giro dentado do hipocampo, para os três grupos.

Nos cérebros em que não se verificavam depósitos de A β , também estavam isentos de placas neuríticas que são normalmente visualizadas em murganhos PDAPP com o anticorpo APP 8E5 humano. Todos os cérebros dos grupos restantes

(murganhos injectados com SAP, PBS e não injectados) apresentavam diversas placas neuríticas, típicas de murganhos PDAPP não tratados. Verificou-se um pequeno número de placas neuríticas num único murganho tratado com AN1792 e verificou-se um conjunto singular de neurites distróficos num segundo murganho tratado com AN1792. As análises de imagens do hipocampo, apresentadas na fig. 3, demonstraram a eliminação virtual de neurites distróficas em murganhos tratados com AN1792 (mediana de 0,00%), comparativamente com os murganhos de PBS (mediana de 0,28%, $p = 0,0005$).

A astrocitose característica de inflamação associada a placas também estava ausente nos cérebros do grupo injectado com A β 1-42. Os cérebros dos murganhos dos outros grupos apresentaram astrócitos GFAP positivos agrupados e abundantes, os quais são típicos de gliose associada a placas A β . Um subconjunto de lâminas de microscópio reagidas com GFAP foi contra-manchado com tioflavina S para se localizar os depósitos de A β . Os astrócitos GFAP positivos foram associados com placas A β para os grupos de controlo de SAP, PBS e não tratados. Não se verificou tal associação em murganho tratados com A β 1-42 negativos para placas, tendo sido identificada gliose mínima associada a placas para um murganho tratado com AN1792.

As análises de imagem, apresentadas na fig. 4 para o córtex retrosplenial, confirmaram que a redução em astrocitose foi significativa com um valor mediano de 1,56% para aqueles tratados com AN1792 em relação aos valores superiores a 6% para os grupo imunizados com péptidos SAP, PBS ou não tratado ($p = 0,0017$).

AS evidências a partir de um subconjunto de murganhos injectados com A β 1-42 e com PBS indicaram a ausência de imuno-reactividade para MHC II associados a placas em murganhos injectados com A β 1-42, consistente com a ausência de uma resposta inflamatória associada a A β .

Também se efectuou reacções de secções de cérebro dos murganhos com mAb específicos mAb e com um anticorpo monoclonal específico para MAC-1, uma proteína da superfície da célula. A MAC-1 (CD11b) é um membro da família das integrinas e existe sob a forma de um heterodímero com CD 18. O complexo CD11b/CD19 está presente em monócitos, macrófagos, neutrófilos e células assassinas naturais (M α rk e Simard).

O tipo de células reactivas com MAC-1 residente no cérebro é provavelmente de microgliócitos com base numa morfologia fenotípica semelhante em secções imuno-reagidas com MAC-1. A marcação de MAC-1 associada a placas foi reduzida no cérebro de murganhos tratados com AN1792 em comparação com o grupo de controlo de PBS, que é uma conclusão consistente com a ausência de uma resposta inflamatória induzida por A β .

C. CONCLUSÃO

A ausência de placas A β e de alterações reactivas neuronais e glióticas no cérebro de murganhos injectados com A β 1-42 indica que se verificou o depósito de nenhum ou de um valor extremamente reduzido de amilóides nos seus cérebros, não se verificando também as consequência patológicas, tais como gliose e patologia neurítica. Os murganhos PDAPP tratados com A β 1-42 apresentaram praticamente a mesma ausência de patologia do que os

murganhos de controlo não transgénicos. Assim sendo, as injecções de A β 1-42 são bastante eficazes para prevenir a deposição ou para a limpeza de A β humano no tecido cerebral e para a eliminação subsequente de alterações degenerativas inflamatórias e neuronais. Assim, a administração de um péptido A β pode apresentar benefícios preventivos e terapêuticos para a prevenção da DA.

II. ESTUDO DE RESPOSTA À DOSE

Grupos de murganhos fêmeas da estirpe Swiss Webster, 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 μ g de A β formulado em CFA/IFA, administrado por via intraperitoneal. Três doses foram administradas em intervalos bissemanais e a quarta dose um mês depois. A primeira dose foi emulsionada com CFA, sendo as restantes doses emulsionadas com IFA. Efectuou-se a recolha de sangue 4 a 7 dias após cada imunização com início após a segunda dose para a determinação dos títulos de anticorpo. Aos animais num subconjunto de três grupos, aqueles imunizados com 11, 33 ou 300 μ g de antigénio, também foi recolhido sangue em intervalos mensais durante 4 meses após a quarta imunização para monitorizar a queda da resposta ao anticorpo para diversas doses de formulações imunogénicas. Estes animais receberam uma quinta imunização setes meses após o início do estudo. Foram sacrificados uma semana depois para se determinar as respostas de anticorpos para AN1792 e para a realização de análises toxicológicas.

Uma diminuição da resposta à dose foi observada para concentrações entre 300 μ g e 3,7 μ g, não tendo sido verificada resposta para as duas doses mais baixas. Os

títulos médios de anticorpo foram de cerca de 1:1000 após 3 doses e cerca de 1:10000 após 4 doses de 11 a 300 µg de antigénio (veja-se a fig. 5).

Os títulos de anticorpo aumentaram drasticamente para todos, embora o grupo de dose mais baixa apenas após a terceira imunização, com aumentos em GMT compreendidos entre 5 e 25 vezes. As respostas baixas de anticorpos foram então detectáveis mesmo para a dose de 0,4 µg. Os grupos de 1,2 µg e 3,7 µg apresentaram títulos comparáveis com GMT de cerca de 1000 e as quatro doses mais elevadas apresentaram em conjunto valores de GMT de cerca de 25000, com a excepção do grupo de dose de 33 µg com um valor inferior de GMT de 3000. Após a quarta imunização, o aumento do título foi mais modesto para a maior parte dos grupos. Verificou-se uma resposta à dose evidente para todos os grupos de dose de antigénio mais baixa compreendida entre 0,14 µg e 11 µg, que variou desde anticorpos não detectáveis para os pacientes de 0,14 µg até um valor de GMT de 36000 para os pacientes de 11 µg. Novamente os títulos para os grupos das quatro doses mais elevadas, 11 µg a 300 µg, apresentaram valores semelhantes. Assim, após duas imunizações, o título de anticorpo era dependente da dose de antigénio ao longo de um intervalo amplo compreendido entre 0,4 e 300 µg. Na terceira imunização, os títulos das quatro doses mais elevadas eram todos comparáveis e permaneceram num patamar após uma imunização inicial.

Um mês após a quarta imunização, os títulos eram 2 a 3 vezes superiores para o grupo de 300 µg do que os valores medidos para a recolha de sangue cinco dias após a imunização (fig. 6). Esta observação sugere que o pico de resposta de anticorpo amamnéstico ocorreu após 5 dias pós-

imunização. Verificou-se um aumento mais modesto (50%) neste tempo para o grupo de 33 µg. No grupo da dose de 300 µg, dois meses após a última dose, o GMT tinha diminuído acentuadamente de cerca de 70%. Decorrido mais um mês, a diminuição foi menos acentuada de 45% (100 µg) e cerca de 14% para as doses de 33 µg e 11 µg. Assim, a taxa de diminuição nos títulos de anticorpo em circulação após a paragem de imunização parece ser bifásica, apresentando uma diminuição acentuada no primeiro mês após o pico de resposta, sendo seguida por uma taxa de diminuição mais modesta posterior.

Os títulos de anticorpo e a cinética da resposta destes murganhos da estirpe Swiss Webster forma semelhantes aos dos murganhos transgénicos PDAPP heterozigóticos jovens imunizados de um modo idêntico. As dosagens eficazes para induzir uma resposta imune em humanos são tipicamente semelhantes às doses eficazes em murganhos.

III. PESQUISA DE EFICÁCIA TERAPÊUTICA CONTRA A DA ESTABELECIDADA

Este ensaio é concebido para testar agentes imunogénicos quanto à actividade para parar ou inverter as características neuropatológicas da DA em animais idosos. As imunizações com A β comprimido de 42 aminoácidos (AN1792) tiveram início num momento em que já estavam presentes placas amilóides nos cérebros de murganhos PDAPP.

Ao longo do decurso deste estudo, murganhos PDAPP não tratados desenvolveram diversas alterações neurodegenerativas semelhantes às verificadas na DA (Games *et al.*, *supra* e Johnson-Wood *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1550-1555 (1997)). A deposição de A β em placas amilóides está

associada a uma resposta neuronal degenerativa constituída por elementos axonais e dendríticos aberrantes, designados por neurites distróficas. Os depósitos amilóides que estão rodeados e que contêm neurites distróficas são designados por placas neuríticas. Tanto na DA como nos murghinhos PDAPP, as neurites distróficas apresentam uma estrutura globular distinta, são imunorreactivos com um conjunto de anticorpos que reconhecem APP e componentes citoesqueléticos e apresentam alterações degenerativas subcelulares complexas ao nível intraestrutural. Estas características permitem determinações reprodutíveis, selectivas e relevantes para a doença da formação de placas neuríticas em cérebros de PDAPP. O componente neuronal distrófico de placas neuríticas de PDAPP é facilmente visualizado com um anticorpo específico para APP humana (anticorpo monoclonal 8E5) e é facilmente determinado por análise de imagem assistida por computador. Assim sendo, para além de se determinar o efeito de An1792 sobre a formação de placas amilóides, foi monitorizado o efeito deste tratamento no desenvolvimento de distrofia neurítica.

Os astrócitos e microgliócitos são células não neuronais que respondem e reflectem o grau de lesão neuronal. Os astrócitos GFAP positivos e os microgliócitos MHC II positivos são frequentemente observados na DA e a sua activação aumenta com a gravidade da doença. Assim sendo, também se monitorizou o desenvolvimento de astrócitos e microgliócitos reactivos em murghinhos tratados com AN1792.

A. Materiais e métodos

Foram utilizados quarenta e oito murganhos PDAPP fêmeas heterozigóticos com 11 a 11,5 meses de idade, provenientes de Charles River, os quais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: 24 murganhos que irão ser imunizados com 100 µg de AN1792 e 24 murganhos que irão ser imunizados com PBS, ambos combinados com adjuvante de Freund. Os grupos de AN1792 e de PBS foram novamente divididos quando atingiram ~15 meses de idade. Aos 15 meses de idade, metade de cada grupo de animais tratados com AN1792 e com PBS foram submetidos a eutanásia (n = 10 e 9, respectivamente), tendo os restantes continuado a receber a imunizações até ao seu término, ~18 meses de idade (n = 9 e 12, respectivamente). Um total de animais (5 AN1792, 3 PBS) morreu durante o estudo. Para além dos animais imunizados, foram incluídos murganhos PDAPP não tratados com um ano de idade (n=10), 15 meses de idade (n=10) e 18 meses de idade para comparação em ensaios ELISA, para se determinar os níveis de Aβ e de APP no cérebro; os animais com um ano de idade também foram incluídos nas análises imuno-histoquímicas.

A metodologia foi idêntica à do exemplo I, salvo quando indicado de outro modo. Foram utilizados péptidos AN1792 de US Peptides lote 12 e California Peptides lote ME0339 para a preparação do antigénio para as seis administrações administradas antes dos 15 meses. Foram utilizados péptidos de California Peptides, lotes ME0339 e ME0439 para as três imunizações suplementares administradas entre os 15 e os 18 meses.

Para as imunizações, 100 µg de AN1792 em 200 µL de PBS ou PBS por si só foram emulsionados a 1:1 (vol:vol) com

adjuvante completo de Freund (CFA) ou com adjuvante incompleto de Freund (IFA) ou com PBS para um volume final de 400 μ L. A primeira imunização foi administrada com CFA como adjuvante, as quatro doses seguintes foram administradas com IFA e as quatro últimas doses foram administradas com PSB por si só, na ausência da adição de adjuvante. Foram realizadas um total de nove imunizações ao longo de um período de sete meses num regime de duas semanas para as primeiras três doses, seguido por um intervalo de quatro semanas para as injeções restantes. O grupo de tratamento de quatro meses, submetido a eutanásia aos 15 meses de idade, recebeu apenas as primeiras 6 imunizações.

B. Resultados

1. Efeito do tratamento com A β 42 (AN1792) na carga amilóide

Os resultados do tratamento com AN1792 sobre a carga amilóide cortical determinados por análise quantitativa de imagens são apresentados na fig. 7. O valor mediano da carga amilóide cortical foi de 0,28% para o grupo de murganhos PDAPP não tratado com 12 meses de idade, que é um valor representativo da carga de placa em murganhos no início do estudo. Aos 18 meses, a carga amilóide aumentou 17 vezes até 4,87% em murganhos tratados com PBS, ao passo que os murganhos tratados com AN1792 apresentaram uma carga amilóide significativamente reduzida de apenas 0,01%, consideravelmente inferior à dos grupos não tratados com 12 meses e dos grupos tratados com PBS aos 15 e 18 meses. A carga amilóide foi significativamente reduzida para os

pacientes que receberam AN1792 aos 15 meses (redução de 96%; $p = 0,003$) e aos 18 meses (redução > 99%; $p = 0,0002$).

Tipicamente, a deposição amilóide cortical em murganhos PDAPP tem início nos córtices frontal e retrosplenial (RSC) e progride numa direcção ventral-lateral para envolver os córtices temporal e entorinal (EC). Em murganhos com 12 meses de idade não foi encontrado, ou foi encontrada uma pequena quantidade, de amilóides no EC, que é a idade aproximada da primeira administração de AN1792. Após 4 meses de tratamento com AN1792, a deposição amilóide foi significativamente diminuída no RSC e o envolvimento progressivo no EC foi totalmente eliminado pelo tratamento com AN1792. As últimas observações indicaram que o AN1792 parou completamente a progressão de amilóides, a qual iria normalmente invadir os córtices temporal e ventral, bem como interrompeu, ou possivelmente inverteu, a deposição no RSC.

Os efeitos profundos do tratamento com AN1792 sobre o desenvolvimento da carga amilóide cortical em murganho PDAPP foram ainda demonstrados pelo grupo de 18 meses, o qual foi submetido a tratamento durante sete meses. Verificou-se uma ausência praticamente completa de amilóide cortical nos murganhos tratados com AN1792, com uma ausência total de placas difusas, bem como uma redução em depósitos compactados.

2. Alterações celulares e morfológicas associadas ao tratamento com A β 42 (AN1792)

Uma população de células A β positivas foi encontrada em regiões do cérebro que continham tipicamente depósitos amilóides. Notavelmente, em vários cérebros de pacientes

que receberam AN1792, foram encontradas muito poucas ou mesmo nenhuma placas amilóides corticais extracelulares. A maior parte de imuno-reatividade de A β parece estar contida dentro das células com uma larga soma lobular ou agrupada. Fenotipicamente, estas células assemelham-se a microgliócitos ou monócitos activados. Foram imuno-reativos com anticorpos que reconhecem os ligandos expressos por monócitos ou microgliócitos activados (MHC II e CD11b) e foram ocasionalmente associados com as paredes ou com o lúmen dos vasos sanguíneos. A comparação de secções adjacentes próximas marcadas com anticorpos A β e anticorpos específicos para MHC II revelou que os padrões semelhantes destas células eram reconhecidos por ambas as classes de anticorpos. Um exame mais detalhado de cérebros tratados com AN1792 revelou que as células MHC II positivas estavam restritas à vizinhança dos limites de amilóides que restavam nestes animais. Sob as condições de fixação utilizadas, as células não eram imuno-reativas com os anticorpos que reconhecem os ligandos de células T (CD3, CD3e) ou de células B (CD45RA, CD45RB) ou do antigénio comum de leucócitos (CD45), mas foram reactivas com um anticorpo que reconhece leucosialina (CD43), que inter-reage com monócitos. Não foram encontradas tais células em quaisquer murganhos tratados com PBS.

Os murganhos PDAPP desenvolvem invariavelmente uma forte deposição amilóide na camada molecular exterior do giro dentado do hipocampo. A deposição forma uma linha distinta na via perfurante, que é uma subregião que contém normalmente placas amilóides na DA. O aparecimento característico destes depósitos em murganhos tratados com PBS assemelha-se ao caracterizado antes para murganhos não

tratados. A deposição amilóide é constituída por placas difusas e compactadas numa banda contínua. Pelo contrário, em diversos cérebros de murganhos tratados com AN1792 este padrão foi drasticamente alterado. A deposição amilóide no hipocampo já não continha amilóides difusos e o padrão em banda com completamente interrompido. Em vez disso, estavam presentes diversas estruturas pontuais não habituais, as quais são reactivas com anticorpos anti-A β , em que muitas delas pareciam ser células que continham amilóides.

As células MCH II positivas são frequentemente observadas na vizinhança de amilóides extracelulares em animais tratados com AN1792. O padrão de associação de células A β positivas com amilóides é bastante semelhante em diversos cérebros provenientes de murganhos tratados com AN1792. A distribuição destas células monocíticas estava restringida à proximidade dos amilóides depositados e estava totalmente ausente de outras regiões do cérebro destituídas de placas de A β .

A análise quantitativa de imagens de secções marcadas com MHC II e com MAC I indicou uma tendência para o aumento de imuno-reactividade no RSC e no hipocampo de murganhos tratados com AN1792 em comparação com o grupo PBS, que atingiram significância com a medição da reactividade de MAC 1 no hipocampo.

Estes resultados são indicativos da remoção activa e mediada por células de amilóides em regiões do cérebro que contêm placas.

3. Efeito de AN1792 nos níveis de A β : medições pelo método ELISA

(a) Níveis corticais

Em murganhos PDAPP não tratados, o nível mediano de A β total no córtex aos 12 meses era de 1600 ng/g, o qual aumentou para 8700 ng/g aos 15 meses (quadro 4). Aos 18 meses, o valor era de 22000 ng/g, que constitui um aumento superior a 10 vezes durante o decurso da experiência. Os animais tratados com PBS apresentaram um valor de 8600 ng/g de A β total aos 15 meses, o qual aumentou para 19000 ng/g aos 18 meses. Pelo contrário, os animais tratados com AN1792 apresentaram um valor 81% inferior de A β total aos 15 meses (1600ng/g) d que o grupo imunizado com PBS. Quando se efectuou a comparação entre os grupos de AN1792 e de PBS, verificou-se um valor de A β total (5200 ng/g) significativamente inferior ($p = 0,0001$), aos 18 meses, o que representa uma redução de 72% em A β , o qual estaria presente de outro modo. Foram obtidos resultados semelhantes quando se efectuou a comparação dos níveis corticais de A β , nomeadamente que o grupo tratado com AN1792 apresentava uma quantidade muito menor de A β , embora neste caso a diferença entre os grupos de AN1792 e de PBS seja significativa aos 15 meses ($p = 0,04$) e aos 18 meses ($p = 0,0001$, quadro 4).

QUADRO 4: níveis medianos de AB (ng/g) no córtex

Idade	NÃO TRATADO			PBS			AN1792		
	Total	A β 42	(n)	Total	A β 42	(n)	Total	A β 42	(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 no hipocampo

Em murganços PDAPP não tratados, os níveis medianos no hipocampo de A β total aos doze meses de idade foram de 15000 ng/g, o qual aumentou para 51000 ng/g aos 15 meses e para 81000 ng/g aos 18 meses (quadro 5). De um modo semelhante, os murganços imunizados com PBS apresentaram valores de 40000 ng/g e de 65000 ng/g aos 15 meses e 18 meses, respectivamente. Os animais imunizados com AN1792 exibiram um valor inferior de A β total, em particular de 25000 ng/g e de 51000 ng/g para os 15 meses e 18 meses, respectivamente. O valor do grupo tratado com AN1792 aos 18 meses foi significativamente inferior do que o valor do grupo tratado com PBS ($p = 0,0105$; quadro 5). As medições de A β 42 apresentaram o mesmo padrão de resultados, nomeadamente os níveis do grupo tratado com AN1792 foram significativamente inferiores aos do grupo de PBS (39000 ng vs. 57000 mg/g, respectivamente; $p = 0,002$), para a avaliação aos 18 meses (quadro 3).

QUADRO 5: níveis medianos de AB (ng/g) no hipocampo

Idade	NÃO TRATADO			PBS			AN1792		
	Total	A β 42	(n)	Total	A β 42	(n)	Total	A β 42	(n)
12	15500	11100	(10)						
15	51500	44400	(10)	40100	35,70	(9)	24,50	22100	(10)
18	80000	64200	(10)	65400	57,10	(12)	50,90	38900**	(9)
* p = 0,0105									
** p = 0,0022									

(c) Níveis no cerebelo

Em murganhos PDAPP não tratados com 12 meses, o nível mediano no cerebelo de A β total foi de 15 ng/g (quadro 6). Aos 15 meses, este valor mediano aumentou para 28 ng/g e aos 18 meses aumentou para 35 ng/g. Os animais tratados com PBS apresentaram valores medianos de A β total de 21 ng/g aos 15 meses e de 43 ng/g aos 18 meses. Os animais tratados com AN1792 apresentaram um valor de 22 ng/g de A β total aos 15 meses e um valor significativamente inferior (p = 0,002) de A β total aos 18 meses (25 ng/g) do que o correspondente grupo PBS (quadro 6).

QUADRO 6: níveis medianos de AB (ng/g) no cerebelo

Idade	NÃO TRATADO		PBS		AN1792	
	Total A β	(n)	Total A β	(n)	Total A β	(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. Efeito do tratamento com AN1792 sobre os níveis de APP

A APP- α e a molécula APP de comprimento completo contêm uma parte ou a totalidade da sequência de A β , podendo assim sofrer o impacto potencial da geração de uma resposta imune dirigida a AN1792. Em estudos realizados até ao momento, foi observado um ligeiro aumento nos níveis de APP à medida em que a neuropatologia aumenta em murganhos PDAPP. No córtex, os níveis de APP- α /FL (comprimento completo) ou de APP- α permaneceram praticamente inalterados com o tratamento, com a exceção de que o nível de APP- α ter sido reduzido em 19% aos 18 meses no grupo tratado com AN1792 vs. grupo tratado com PBS. Os valores de APP do grupo tratado com AN1792 aos 18 meses não são significativamente diferentes dos valores dos grupos não tratados aos 12 meses e aos 15 meses e do grupo de PBS aos 15 meses. Em todos os casos, os valores de APP permaneceram nos intervalos normalmente encontrados em murganhos PDAPP.

5. Efeitos do tratamento com AN1792 em patologias neurodegenerativas e glióticas

A carga de placa neurítica foi significativamente reduzida no córtex frontal de murganhos tratados com AN1792 em comparação com o grupo de PBS aos 15 meses de idade (84%; $p = 0,03$) e aos 18 meses de idade (55%; $p = 0,01$) (fig. 8). O valor mediano da carga de placas neuríticas aumentou desde 0,32% para 0,49% no grupo de PBS entre os 15 e os 18 meses de idade. Tal facto contrastou com o desenvolvimento significativamente reduzido de placas neuríticas no grupo de AN1792 com valores medianos de carga de placas neuríticas de 0,05% e 0,22%, para os grupos de 15 e de 18 meses, respectivamente.

As imunizações com AN1792 pareceram bem toleradas e os astrócitos reactivos também foram significativamente reduzidos no RSC de murganhos tratados com AN1792 em comparação com o grupo de PBS, aos 15 meses de idade (56%; $p = 0,011$) e aos 18 meses de idade (39%; $p = 0,028$) (fig. 9). Os valores medianos da percentagem de astrócitos no grupo de PBS aumentaram entre os 15 e os 18 meses desde 4,26% até 5,21%. O tratamento com AN1792 suprimiu o desenvolvimento de astrócitos para ambos os valores de tempo para 1,89% e 3,2%, respectivamente. Tal sugere que o neurópilo não estava a ser danificado pelo processo de limpeza.

6. Respostas de anticorpos

Conforme descrito antes, administrou-se aos murganhos PDAPP heterozigóticos com onze meses de idade ($N = 24$) um conjunto de cinco imunizações de 100 μg de AN1792 emulsionado com adjuvante de Freund, por via intraperitoneal na semana 0, 2, 4, 8 e 12, e uma sexta imunização com PBS por si só (sem adjuvante de Freund) na semana 16. Como controlo negativo, administrou-se a um conjunto paralelo de 24 murganhos transgénicos com uma idade semelhante imunizações com PBS emulsionado com os mesmos adjuvantes e administrados no mesmo regime. Recolheu-se sangue dos animais três a sete dias após cada imunização, com início após a segunda dose. As respostas dos anticorpos a AN1792 foram determinadas pelo método ELISA. As médias geométricas dos títulos (GMT) para os animais imunizados com AN1792 foram aproximadamente de 1900, 7600 e 45000 após a segunda, terceira e última (sexta) doses, respectivamente. Não foi medido o anticorpo

específico de A β para os animais de controlo após a sexta imunização.

Foram tratados aproximadamente metade dos animais durante mais três meses, os quais receberam imunizações nas semanas 20, 24 e 27. Cada uma destas doses foi administrada com veículo PBS por si só na ausência de adjuvante de Freund. Os títulos médios de anticorpo permaneceram inalterados ao longo deste período de tempo. De facto, os títulos de anticorpo parecem manter-se estáveis desde a quarta até à oitava recolhas de sangue, que corresponde ao período compreendido entre a quinta e a nona injeções.

Para se determinar se os anticorpos específicos de A β obtidos por imunização que foram detectados no soro de murganhos tratados com AN1792 também estava associados aos amilóides depositados no cérebro, efectuou-se a reacção de um subconjunto de secções provenientes de murganhos tratados com AN1792 e PBS com um anticorpo específico para IgG de murganho. Ao contrário do grupo de PBS, as placas de A β nos cérebros tratados com AN1792 estavam revestidas com IgG endógeno. Esta diferença entre os dois grupos foi observada para os grupos de 15 meses e de 18 meses. Foi particularmente surpreendente a ausência de marcação no grupo de PBS, apesar da presença de uma carga amilóide pesada nestes murganhos. Estes resultados demonstram que a imunização com uma proteína A β sintética proporciona anticorpos que reconhecem e se ligam *in vivo* ao A β em placas amilóides.

7. Respostas imunes mediadas por células

Foram removidos os baços provenientes de 9 murganhos PDAPP com 18 meses de idade imunizados com AN1792 e de 12

murganhos PDAPP com 18 meses de idade imunizados com PBS, 7 dias após a nona imunização. Isolou-se os esplenócitos e manteve-se em cultura durante 72 horas na presença de A β 40, A β 42 ou A β 40-1 (proteína de ordem inversa). O mitogénio Con A serviu como controlo positivo. As respostas óptimas foram obtidas para proteína com uma concentração > 1,7 μ M. As células provenientes dos nove animais tratados com AN1792 proliferaram em resposta às proteínas A β 1-40 ou A β 1-42, com níveis idênticos de incorporação de ambas as proteínas (fig. 10, painel superior). Não se verificou uma resposta para a proteína inversa A β 40-1. As células provenientes de animais de controlo não apresentaram resposta para qualquer uma das proteínas A β (fig. 10, painel inferior).

C. Conclusão

Os resultados deste estudo mostra que a imunização com AN1792 de murganhos PSAPP que apresentem depósitos amilóides existentes abrande e previne a deposição amilóide progressiva e atrasa as alterações neuropatológicas consequentes no cérebro de murganhos PDAPP idosos. As imunizações com AN1792 pararam praticamente o desenvolvimento amilóide em estruturas que iriam normalmente sucumbir a amiloidose. Assim, a administração do péptido A β possui benefícios terapêuticos para o tratamento da DA.

IV. PESQUISA DE FRAGMENTOS DE A β

Cem murganhos PDAPP com 9 a 11 meses de idade foram imunizados com 9 regiões diferentes de APP e de A β para se determinar que epítomos proporcionam a resposta eficaz. Os 9 imunogénios diferentes e um controlo foram injectados

i.p., conforme descrito antes. Os imunogénios compreendem quatro conjugados do péptido A β humano, 1-12, 13-28, 32-42, 1-5, todos eles acoplados a IgG de ovelha anti-murganho por meio de uma ligação cistina; um polipéptido APP dos aminoácidos 592-695, A β 1-40 humana agregada, A β 25-35 humana agregada e A β 42 de roedor agregada. Utilizou-se A β 42 agregada e PBS como controlos positivo e negativo, respectivamente. Foram utilizados dez murganhos por grupo de tratamento. Monitorizou-se os títulos conforme descrito antes e submeteu-se os murganhos a eutanásia ao fim de 4 meses das injeções. Após a morte, foi determinado a histoquímica, os níveis de A β e as análises toxicológicas.

A. Materiais e métodos

1. Preparação de imunogénios

Preparação de péptidos A β acoplados: quatro conjugados de péptidos A β (resíduos aminoácidos 1-5, 1-12, 13-28 e 33-42, cada um dos quais conjugado com IgG de ovelha anti-murganho) foram preparados por acoplamento através de uma cisteína artificial adicionada ao péptido A β , utilizando o reagente reticulado sulfo-EMCS. Os derivados do péptido A β foram sintetizados com as seguintes sequências finais de aminoácidos. Para cada caso, o local do resíduo cisteína inserido é indicado a sublinhado. O derivado do péptidos A β 13-28 também possuía dois resíduos glicina adicionados antes da cisteína no terminal carboxilo, conforme indicado.

péptido A β 1-12 NH₂-DAEFRHDSGYEVC-C-COOH (SEQ ID NO: 30)
 péptido A β 1-5 NH₂-DAEFRC-COOH (SEQ ID NO: 31)
 péptido A β 33-42 NH₂-C-ácido amino-heptanóico-GLMVGWIA-
 -COOH (SEQ ID NO: 32)

péptido A β 13-28 Ac-NH-HHQLVFFAEDVGSNKGCC-COOH (SEQ ID NO: 33)

Para se preparar a reacção de acoplamento, efectuou-se a diálise de 10 mg de IgG de ovelha anti-murganho (Jackson ImmunoResearch Laboratories) de um dia para o outro, contra tampão de borato de sódio 10 mM, pH 8,5. o anticorpo dializado foi então concentrado até um volume de 2 mL utilizando um tubo 'Centriprep Amicon'. Dissolveu-se des mg de sulfo-EMCS [N-(γ -maleimidocaproyloxi)-succinimida] (Molecular Sciences Co.) em 1 mL de água desionizada. Adicionou-se, gota a gota, um excesso molar de 40 vezes de sulfo-EMCS sob agitação ao IgG de ovelha anti-murganho e agitou-se a solução durante mais 10 minutos. Purificou-se o IgG de ovelha anti-murganho activado e efectuou-se a permuta com tampão por meio da passagem numa coluna de filtração com gel de 10 mL (Pierce Presto Column, proveniente da Pierce Chemicals), em equilíbrio com NaPO₄ 0,1 M, EDTA 5 mM, pH 6,5. Recolheu-se as fracções que continham o anticorpo, identificadas por absorvância a 280 nm, e diluiu-se até uma concentração aproximadamente de 1 mg/mL, utilizando 1.4 mg de OD como coeficiente de extinção. Dissolveu-se um excesso molar de 40 vezes de péptido A β em 20 mL de NaPO₄ 10 mM, pH 8,0, com a excepção do péptido A β 33-42, para o qual se dissolveu em primeiro lugar 10 mg em 0,5 mL de DMSO e depois se diluiu até 20 mL com o tampão de NaPO₄ 10 mM. Cada uma das soluções de péptido foi adicionada a 10 mL de IgG de ovelha anti-murganho activada e arrefeceu-se à temperatura ambiente durante 4 horas. Concentrou-se os conjugados resultantes até um volume final inferior a 10 mL, utilizando um tubo 'Centriprep Amicon' e depois efectuou-se a diálise contra

PBS para a permuta do tampão e removeu-se o péptido livre. Fez-se passar os conjugados através de filtros com um tamanho de poro de 0,22 μm para esterilização, depois dividiu-se em fracções de 1 mg e armazenou-se congelado a -20°C . Determinou-se as concentrações dos conjugados utilizando o ensaio de proteínas BCA (Pierce Chemicals), utilizando IgG de cavalo para a curva padrão. Registou-se a conjugação por meio do aumento do peso molecular dos péptidos conjugados em relação ao do IgG de ovelha anti-murganho activada. O conjugado A β 1-5 de ovelha anti-murganho era constituído por um conjunto de duas conjugações, sendo os restantes provenientes de uma preparação individual.

2. Preparação de péptidos A β agregados

Péptidos humanos 1-40 (AN1528; California Peptides Inc., Lote ME0541), humanos 1-42 (AN1792; California Peptides Inc., Lotes ME0339 e ME0439), humanos 25-35 e de roedores 1-42 (California Peptides Inc., Lote ME0218) foram solubilizados no momento para a preparação de um conjunto de injeções a partir de pós liofilizados que tinham sido armazenados e desidratados a -20°C . Para este propósito, adicionou-se 2 mg de péptido a 0,9 mL de água desionizada e centrifugou-se a mistura para se obter uma solução ou suspensão relativamente uniforme. Dos quatro, o péptido AN1528 foi o único péptido solúvel neste passo. Adicionou-se então uma aliquota de 100 μL de 10X PBS (1X PBS: NaCl 0,15 M, fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,5), instante esse no qual o péptido AN1528 começou a precipitar. Centrifugou-se novamente a suspensão e manteve-se a incubar de um dia para o outro a 37°C , para utilização no dia seguinte.

Preparação da proteína pBx6: construiu-se um plasmídeo de expressão que codifica pBx6, uma proteína de fusão constituída pela sequência líder do terminal N de MS-2-polimerase de bacteriofagos com 100 aminoácidos seguida pelos aminoácidos 592-695 de APP (β APP), conforme descrito por Oltersdorf et al., J. Biol. Chem. 265, 4492-4497 (1990). Transfectou-se o plasmídeo para *E. coli* e expressou-se a proteína após indução do promotor. Efectuou-se a lise da bactéria em ureia 8 M e purificou-se parcialmente pBx6 por SDS-PAGE preparativa. Identificou-se as fracções que continham pBx6 por transferência de Western utilizando anticorpo policlonal de coelho anti-pBx6, recolheu-se, concentrou-se utilizando um tubo 'Centriprep Amicon' e submeteu-se novamente a diálise com PBS. A pureza da preparação, estimada por SDS PAGE manchada com azul de Coomassie, foi aproximadamente de 5% a 10%.

B. Resultados e discussão

1. Concepção do estudo

Cem murganhos transgênicos PDAPP heterozigóticos, machos e fêmeas, com nove a onze meses de idade foram obtidos a partir do Charles River Laboratory e do Taconic Laboratory. Os murganhos foram distribuídos em dez grupos, os quais irão ser imunizados com regiões diferentes de A β ou de APP combinadas com adjuvante de Freund. Os animais foram distribuídos de forma a corresponderem em termos género, idade, grau de parentesco e fonte dos animais dentro dos grupos, tão aproximadamente quanto possível. Os imunogénios incluíam quatro péptidos A β provenientes de sequências humanas 1-5, 1-12, 13-28 e 33-42, cada uma das

quais conjugada com IgG de ovelha anti-murganho; quatro péptidos A β agregados, humano 1-40 (AN1528), humano 1-42 (AN1792), humano 25-35 e de roedor 1-42; e um polipéptido de fusão, designado por pBx6, que contém os resíduos aminoácidos 592-695 de APP. Efectuou-se a imunização de um décimo grupo com PBS combinado com o adjuvante enquanto controlo.

Para cada imunização, emulsionou-se, a 1:1 (vol:vol), 100 μ g de cada péptido A β em 200 μ L de PBS ou 200 μ g do derivado pBx6 de APP num volume igual de PBS ou PBS por si só com adjuvante completo de Freund (CFA) com um volume final de 400 μ L para a primeira imunização, seguindo-se um reforço com a 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 por via intraperitoneal num regime bissemanal para as três primeiras doses, seguindo-se um regime mensal. Efectuou-se a recolha de sangue dos animais quatro a sete dias após cada imunização, com início após a segunda dose, para se determinar os títulos de anticorpo. Efectuou-se a eutanásia dos animais aproximadamente uma semana após a dose final.

2. Níveis de A β e de APP no cérebro

Após cerca de quatro meses de imunização com os vários péptidos A β ou com o derivado de APP, removeu-se os cérebros a partir de animais cobertos com soluto salino. Preparou-se um hemisfério para análise imuno-histoquímica e utilizou-se o segundo para a quantificação dos níveis de A β e de APP. Para se determinar as concentrações das diversas formas do péptido β -amilóide e da proteína precursora

amilóide, dissecou-se o hemisfério e preparou-se homogenados das regiões do hipocampo, do córtex e do cerebelo em guanidina 5 M. Estas foram diluídas e quantificou-se o nível de amilóide ou de APP por comparação com um conjunto de diluições de padrões do péptido A β ou de APP com concentrações conhecidas num formato ELISA.

A concentração mediana de A β total para o grupo de controlo imunizado com PBS foi 5,8 vezes superior no hipocampo do que no córtex (mediana de 24,318 ng/g de tecido do hipocampo em comparação com 4,221 ng/g para o córtex). O nível mediano no cerebelo do grupo de controlo (23,4 ng/g de tecido) foi cerca de 1000 vezes superior ao nível do hipocampo. Estes níveis são idênticos aos anteriormente descritos para murganhos transgênicos PDAPP heterozigóticos com esta idade (Johnson-Woods *et al.*, 1997, *supra*).

Para o córtex, um subconjunto dos grupos de tratamento apresentava níveis medianos de A β total e de A β 1-42 que eram significativamente diferentes dos obtidos para o grupo de controlo ($p < 0,05$), aqueles animais que receberam o conjugado do péptido AN1792, A β 1-42 de roedor ou A β 1-5, conforme ilustrado na fig. 11. Os níveis medianos de A β total foram reduzidos em 75%, 79% e 61% respectivamente, em comparação com os níveis de controlo para esses grupos de tratamento. Não foram observadas correlações discerníveis entre os títulos de anticorpo específicos de A β e os níveis de A β na região cortical do cérebro de qualquer um dos grupos.

No hipocampo, a redução mediana de A β total associada ao tratamento com AN1792 (46%, $p = 0,0543$) não foi tão grande como a observado no córtex (75%, $p = 0,0021$). No

entanto, a magnitude da redução foi bastante superior no hipocampo do que no córtex, uma redução total de 11,186 ng/g de tecido no hipocampo *versus* 3,171 ng/g de tecido no córtex. Para os grupos de animais que receberam A β 1-42 de roedor ou A β 1-5, os níveis medianos de A β total foram reduzidos em 36% e 26%, respectivamente. No entanto, devido aos tamanhos pequenos dos grupos e a uma elevada variabilidade dos níveis de péptido amilóide de animal para animal dentro de ambos os grupos, estas reduções não são significativas. Quando os níveis de A β 1-42 foram determinados no hipocampo, nenhuma das reduções induzidas pelos tratamentos foi significativa. As alterações nos níveis de A β determinadas por métodos ELISA no córtex são semelhantes, embora não idênticas, aos resultados da análise imuno-histoquímica (ver *infra*).

O A β total também foi determinado no cerebelo, uma região tipicamente pouco afectada por patologias da DA. Nenhuma das concentrações medianas de A β de qualquer um dos grupos imunizados com os diversos péptidos A β ou com o derivado APP foram diferentes dos obtidos para o grupo de controlo nesta região do cérebro. Este resultado sugere que os níveis não patológicos de A β não são afectados pelo tratamento.

A concentração de APP também foi determinada por ELISA no córtex e no cerebelo de murganhos tratados e de controlo. Foram utilizados dois ensaios diferentes de APP. O primeiro, designado por APP-~/FL, reconheceu APP- α (α , a forma segregada de APP que foi clivada na sequência de A β) e as formas de comprimento completo (FL) de APP, ao passo que o segundo reconheceu apenas APP- α . Em contraste com a diminuição de A β associada ao tratamento num subconjunto

dos grupos de tratamento, os níveis de APP permaneceram inalterados para todos os animais tratados em comparação com os animais de controlo. Estes resultados indicam que as imunizações com péptidos A β não fazem desaparecer a APP; em vez disso, o efeito do tratamento é específico para A β .

Resumidamente, os níveis de A β total e de A β 1-42 foram significativamente reduzidos no córtex por meio do tratamento com AN1792, A β 1-42 de roedor ou conjugado A β 1-5. No hipocampo, o nível de A β total foi significativamente reduzido apenas pelo tratamento com AN1792. Não houve outras alterações significativas associadas ao tratamento nos níveis de A β ou de APP nas regiões do hipocampo, do córtex ou do cerebelo.

2. Análises histo-químicas

Os cérebros de um subconjunto de seis grupos foram preparados para análise imuno-histoquímica, três grupos imunizados com os conjugados do péptido A β A β 1-5, A β 1-12 e A β 13-28; dois grupos imunizados com os agregados de A β de comprimento completo AN1792 e AN1528 e um grupo de controlo tratado com PBS. Os resultados de análises de imagens da carga amilóide nas secções do cérebro destes grupos são apresentados na fig. 12. Foram observadas reduções significativas na carga amilóide nas regiões corticais de três dos grupos de tratamento vs. animais de controlo. A maior redução da carga amilóide foi observada no grupo que recebeu An1792, no qual o valor médio foi reduzido em 97% ($p = 0,001$). Também foram observadas reduções significativas para os animais tratados com AN1528 (95%, $p = 0,005$) e com o conjugado peptídico A β 1-5 (67%, $p = 0,02$).

Os resultados obtidos por quantificação de A β total ou de A β 1-42 por ELISA e da carga amilóide por análise de imagens apresentavam algumas diferenças. O tratamento com AN1528 teve um impacto significativo no nível da carga amilóide cortical quando determinado por análise quantitativa de imagens mas não sobre a concentração de A β total para a mesma região quando determinado por ELISA. A diferença entre estes dois resultados é provavelmente devida a especificidades dos ensaios. A análise de imagens mede apenas A β insolúvel agregado em placas. Pelo contrário, a análise ELISA mede todas as formas de A β , solúveis ou insolúveis, monoméricas e agregadas. Uma vez que se prevê que a patologia da doença esteja associada com a forma insolúvel de A β associada a placas, então a técnica de análise de imagens podem ser mais sensível para a obtenção do efeito do tratamento. No entanto, uma vez que a análise ELISA é mais rápida e é um ensaio mais fácil, é bastante útil para fins de pesquisa. Além do mais, pode revelar que uma redução associada ao tratamento de A β é superior para A β associado a placas do que para A β total.

Para se determinar se os anticorpos específicos de A β obtidos por imunização em animais tratados reagem com o amilóide depositado no cérebro, fez-se reagir um subconjunto de secções provenientes de animais tratados e de murganhos de controlo com um anticorpo específico para IgG de murganho. Ao contrário do grupo PBS, as placas que continham A β foram revestidas com IgG endógeno para os animais imunizados com os conjugados peptídicos de A β , A β 1-5, A β 1-12 e A β 13-28; e com os agregados de A β de comprimento completo, AN1792 e AN1528. Os cérebros de

animais imunizados com outros péptidos A β ou com o péptido de APP, pBx6, não foram analisados neste ensaio.

3. Determinação dos títulos de anticorpo

Efectuou-se a recolha de sangue de murganhos quatro a sete dias após cada imunização, com início na segunda imunização, num total de cinco recolhas de sangue. Determinou-se os títulos de anticorpo, como anticorpo ligado a A β 1-42, utilizando o método de sanduíche ELISA com placas de plástico multi-cavidades revestidas com A β 1-42. Conforme ilustrado na fig. 13, o pico dos títulos de anticorpo foram obtidos após a quarta dose para as quatro formulações de imunização que proporcionaram os títulos mais elevados de anticorpos específicos de AN1792: AN1792 (pico GMT: 94647), AN1528 (pico GMT: 88231), conjugado A β 1-12 (pico GMT: 47216) e A β 1-42 de roedor (pico GMT: 10766). Os títulos para estes grupos diminuíram um pouco após a quinta e a sexta doses. Para os cinco imunogénios restantes, os picos dos títulos foram atingidos após a quinta ou a sexta dose e apresentaram uma magnitude muito menos comparativamente com os quatro grupos com os títulos mais elevados: conjugado A β 1-5 (pico GMT: 2356), pBx6 (pico GMT: 1986), conjugado A β 13-28 (pico GMT: 1183), conjugado A β 33-42 (pico GMT: 658), A β 25-35 (pico GMT: 125). Os títulos de anticorpo também foram determinados contra os péptidos homólogos utilizando o mesmo formato ELISA em sanduíche para um subconjunto para os imunogénios, aqueles grupos imunizados com A β 1-5, A β 13-28, A β 25-35, A β 33-42 ou A β 1-42 de roedor. Estes títulos forma praticamente idênticos aos medidos contra A β 1-42, excepto para o imunogénio A β 1-42 de roedor, caso este em que os títulos de anticorpos contra o

imunogénio homólogo foram cerca de duas vezes superior. A magnitude do título do anticorpo específico de AN1792 para animais individuais ou os valores médios para os grupos de tratamento não estavam correlacionados com a eficácia, medida como a redução de A β no córtex.

4. Respostas linfoproliferativas

Determinou-se a linfoproliferação dependente de A β utilizando células de baço colhidas aproximadamente uma semana após a imunização final, sexta. As células colhidas no momento, 105 por cavidade, foram mantidas em cultura durante 5 dias na presença de A β 1-40 com uma concentração de 5 μ M, para estimulação. As células de um subconjunto de sete dos dez grupos também foram mantidas em cultura na presença do péptido inverso, A β 40-1. Como controlo positivo, manteve-se em cultura células suplementares com o mitogénio de células T, PHA, e como controlo negativo, manteve-se em cultura células às quais não se tinha adicionado péptido.

Os linfócitos a partir da maioria dos animais proliferaram em resposta a PHA. Não se observaram respostas significativas ao péptido inverso A β 40-1. As células provenientes de animais imunizados com os péptidos A β agregados mais compridos, AN1792, com A β 1-42 de roedor e com AN1528 proliferaram de um modo robusto quando estimuladas com A β 1-40 com o cpm mais elevado nos animais que receberam AN1792. Um animal de cada um dos grupos imunizados com o conjugado A β 1-12, conjugado A β 13-28 e A β 25-35 proliferou em resposta a A β 1-40. Os grupos restantes que receberam o conjugado A β 1-5, conjugado A β 33-42 pBx6 ou PBS, não apresentaram qualquer animal com uma resposta

estimulada por A β . Estes resultados estão agrupados no quadro 7 seguinte.

Quadro 7			
Imunogénio	Conjugado	Aminoácidos A β	Respostas
A β 1-5	Sim	5-mer	0/7
A β 1-12	Sim	12-mer	1/8
A β 13-28	Sim	16-mer	1/9
A β 25-35		11-mer	1/9
A β 33-42	Sim	10-mer	0/10
A β 1-40		40-mer	5/8
A β 1-42		42-mer	9/9
rA β 1-42		42-mer	8/8
pBx6			0/8
PBS		0-mer	0/8

Estes resultados mostram que o AN1792 e o AN1528 estimulam fortes respostas de células T, provavelmente do fenótipo CD4+. A ausência de uma resposta de células T específica de A β em animais imunizados com A β 1-5 não é surpreendente, uma vez que os epítomos do péptido reconhecidos pelas células T CD4+ possuem normalmente cerca de 15 aminoácidos em comprimento, embora péptidos mais pequenos possam actuar por vezes menos eficazmente. Assim, a maioria dos epítomos de células T auxiliares para os quatro conjugados peptídicos residem provavelmente no parceiro conjugado de IgG e não na região de A β . Esta hipótese é confirmada pela incidência muito reduzida de respostas proliferativas em animais para cada um destes grupos de tratamento. Uma vez que o conjugado A β 1-5 foi

eficaz para a redução significativa do nível de A β no cérebro, na ausência aparente de células T específicas de A β , a resposta imune efectora principal induzida pela imunização com este péptido parece ser o anticorpo.

A ausência de células T e a fraca resposta de anticorpos proveniente do péptido de fusão pBx6, que compreende os aminoácidos 592-695 de APP, incluindo todos os resíduos de A β , podem ser devida à fraca imunogenicidade desta preparação particular. A fraca imunogenicidade do agregado A β 25-35 é provavelmente devida ao facto de o péptido ser demasiado pequeno para conter um bom epítopo de células T para auxiliar a indução de uma resposta de anticorpo. É possível antecipar que a conjugação deste péptido com um veículo proteico iria torná-la mais imunogénica.

V. Preparação de anticorpos policlonais para protecção passiva

Efectuou-se a imunização de 125 de murganhos com A β , em conjunto com o adjuvante, e submeteu-se a eutanásia aos 4-5 meses. Recolheu-se o sangue a partir de murganhos imunizados. Separou-se o IgG de outros componentes do sangue. O anticorpo específico para o imunogénio pode ser parcialmente purificado por cromatografia de afinidade. Obtém-se uma média de cerca de 0,5 a 1 mg de anticorpo específico do imunogénio por murganho, obtendo-se um total de 60 a 120 mg.

VI. Imunização passiva com anticorpos para A β

Injectou-se cada grupo de murganhos PDAPP, com 7 a 9 meses de idade, com 0,5 mg em PBS de anticorpos policlonais

anti-A β ou com anticorpos monoclonais específicos anti-A β , conforme a seguir apresentado. Todas as preparações de anticorpos foram purificadas para se obter níveis reduzidos de endotoxina. Os anticorpos monoclonais podem ser preparados contra um fragmento por meio da injeção do fragmento ou de uma forma longa de A β num murganho, produzindo-se hibridomas e pesquisando os hibridomas para um anticorpo que se ligue especificamente a um fragmento desejado de A β sem no entanto se ligar a outros fragmentos de A β não sobrepostos.

Quadro 8

Anticorpo	Epítopo
2H3	A β 1-12
10D5	A β 1-12
266	A β 13-28
21F12	A β 33-42
A β 42 policlonal de murganho anti-humano	A β 42 anti-agregado

Os murganhos foram injectados i.p. consoante necessário ao longo de um período de 4 meses para se manter a concentração de anticorpo em circulação, determinada por titulação ELISA, superior a 1/1000 definida por ELISA para A β 42 ou outro imunogénio. Monitorizou-se os títulos, conforme descrito antes, e submeteu-se os murganhos a eutanásia no final de 6 meses de injeções. As análises de histoquímica, dos níveis de A β e toxicológicas foram efectuadas *post mortem*. Foram utilizados dez murganhos por

grupo. Estudos suplementares de imunização passiva encontram-se descritos nos exemplos XI e XII *infra*.

VII. Comparação de adjuvantes diferentes

Neste exemplo é efectuada a comparação entre CFA, alum, uma emulsão de óleo-em-água e MPL quanto à sua capacidade para estimular uma resposta imune.

A. Materiais e métodos

1. Concepção do estudo

Cem cobaias fêmeas da estirpe Hartley, com seis semanas de idade, provenientes de Elm Hill Breeding Laboratories, Chelmsford, MA, foram distribuídas por dez grupos que irão ser imunizados com AN1792 ou com um seus derivado palmitoilado, combinados com diversos adjuvantes. Sete grupos receberam injeção de AN1792 (33 µg, salvo quando indicado de outro modo) combinado com a) PBS, b) adjuvante de Freund, c) MPL, d) esqualeno, e) MPL/esqualeno f) alum de dose reduzida ou g) alum de dose elevada (300 µg de AN1792). A dois grupos foram administradas injeções de um derivado palmitoilado de AN1792 (33 µg) combinado com a) PBS ou b) esqualeno. Um décimo grupo final recebeu PBS por si só, sem antigénio ou adjuvante suplementar. Para o grupo que recebeu adjuvante de Freund, a primeira dose foi emulsionada com CFA e as restantes quatro doses com IFA. Administrou-se o antigénio numa dose de 33 µg para todos os grupos, excepto o grupo de dose elevada de alum, ao qual foi administrado 300 µg de An1792. As injeções foram administradas por via intraperitoneal para CFA/IFA e por via intramuscular nos quadríceps dos membros posteriores,

alternando entre o lado direito e o esquerdo, para todos os grupos. As primeiras três doses foram administradas num regime bissemanal, seguidas por duas doses num intervalo mensal. Fez-se a recolha de sangue seis a sete dias após cada imunização, tendo início após a segunda dose, para a determinação dos títulos de anticorpo.

2. Preparação de imunogénios

Adicionou-se 2 mg de A β 42 (California Peptide, Lote ME0339) a 0,9 mL de água desionizada e centrifugou-se a mistura para se obter uma suspensão relativamente uniforme. Adicionou-se uma aliquota de 100 μ L de 10X PBS (1X PBS, NaCl 0,15 M, fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,5). Centrifugou-se novamente a mistura e manteve-se a incubar de um dia para o outro a 37°C, para utilização no dia seguinte. Armazenou-se o A β 1-42 não utilizado com desidratante, como um pó liofilizado, a 20°C.

Preparou-se um derivado palmitoilado de AN1792 por acoplamento de anidrido palmítico, dissolvido em dimetilformamida, com o resíduo do terminal amino de AN1792, antes da remoção do péptido nascente da resina por tratamento com ácido hidrofúrico.

Para se preparar doses de formulações imunogénicas com adjuvante completo de Freund (CFA) (grupo 2), emulsionou-se 1:1 (vol:vol) 33 μ g de AN1792 em 200 μ L de PBS com CFA com um volume final de 400 μ L para a primeira imunização. Para as imunizações subsequentes, a antigénio foi igualmente emulsionado com adjuvante incompleto de Freund (IFA).

Para se preparar doses de formulação com MPL para os grupos 5 e 8, adicionou-se pó liofilizado (Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT) a 0,2% de trietilamina aquosa

até uma concentração final de 1 mg/mL e centrifugou-se. Aqueceu-se a mistura até 65°C-70°C durante 30 segundos para se criara uma suspensão uniforme de micelas ligeiramente opaca. A solução foi preparada no momento para cada conjunto de injeções. Para cada injeção no grupo 5, misturou-se 33 µg de AN1792 em 16,5 µL de PBS, 50 µg de MPL (50 µL) e 162 µL de PBS num tubo de silicato de boro, imediatamente antes da utilização.

Para se preparar doses de formulação com a emulsão reduzida do tipo óleo-em-água, adicionou-se AN1792 em PBS a 5% de esqualeno, 0,5% de Tween 80, 0,5% Span 85 em PBS para se atingir uma concentração final de dose individual de 33 µg de AN1792 em 250 µL (grupo 6). Emulsionou-se a mistura por passagem através de um dispositivo, com duas câmaras operado manualmente, 15 a 20 vezes até se obterem gotículas de emulsão com um diâmetro aproximadamente igual a um diâmetro de 1,0 µm de uma gota de látex (convencional, quando observada ao microscópio. A suspensão resultante era branca leitosa opalescente. As emulsões foram preparadas no momento para cada conjunto de injeções. Para o grupo 8, adicionou-se MPL em 0,2% de trietilamina com uma concentração de 50 µg por dose à mistura de esqualeno e detergente para emulsificação, conforme descrito antes. Para o derivados de palmitoílo (grupo 7), adicionou-se 33 µg de palmitoíl-NH-Aβ1-42 por dose a esqualeno e centrifugou-se. Adicionou-se então Tween 80 e Span 85 sob centrifugação. Adicionou-se esta mistura a PBS para se obter concentrações finais de 5% de esqualeno, 0,5% de Tween 80, 0,5% de Span 85, e emulsionou-se a mistura conforme descrito antes.

Para se preparar doses de formulação com alum (grupos 9 e 10), adicionou-se AN1792 em PBS a Al-hidrogel (gel de hidróxido de alumínio, Accurate, Westbury, NY) para se obter concentrações de 33 µg de AN1792 (dose reduzida, grupo 9) ou de 300 µg de AN1792 (dose elevada, grupo 10) por 5 mg de alum, num volume final de dose de 250 µL. Misturou-se suavemente a suspensão durante 4 horas à temperatura ambiente.

3. Determinação dos títulos de anticorpo

Recolheu-se sangue de cobaias seis a sete dias após a imunização, com início após a segunda imunização, num total de quatro recolhas de sangue. Determinou-se os títulos de anticorpo contra Aβ42 pelo método ELISA, tal como descrito na secção Materiais gerais e métodos.

4. Preparação de tecidos

Decorridas cerca de 14 semanas, submeteu-se a eutanásia todas as cobaias por meio da administração de CO₂. Recolheu-se o fluido cerebrospinal, removeu-se os cérebros, dissecou-se três regiões do cérebro (hipocampo, córtex e cerebelo) e utilizou-se para medir a concentração da proteína Aβ total, utilizando o método ELISA.

B. Resultados

1. Respostas dos anticorpos

Obteve-se um intervalo amplo em termos de potência dos diversos adjuvantes quando determinados como resposta do anticorpo a AN1792, após imunização. Conforme ilustrado na fig. 14, no caso de AN1792 ter sido administrado em PBS,

não foram detectados anticorpos após duas ou três imunizações e foram detectadas respostas fracas após a quarta e a quinta doses com médias geométricas dos títulos (GMT) apenas de cerca de 45. A emulsão do tipo óleo-em-água induziu títulos modestos após a terceira dose (GMT 255), os quais foram mantidos após a quarta dose (GMT 301) e diminuíram com a dose final (GMT 54). Verificou-se uma clara resposta à dose de antigénio para AN1792 ligado a alum, em que a dose de 300 µg foi mais imunogénica para qualquer valor de tempo do que a dose de 33 µg. No pico da resposta de anticorpo, após a quarta imunização, a diferença entre as duas doses era de 43% com GMT de cerca de 1940 (33 µg) e de 3400 (300 µg). A resposta de anticorpo para a dose de 33 µg de AN1792 mais MPL foi bastante semelhante à obtida para a de uma dose de antigénio (300 µg) praticamente 10 vezes superior ligada a alum.

A adição de MPL a uma emulsão do tipo óleo-em-água diminuiu a potência da formulação em relação à de MPL como adjuvante único, num valor tão grande como 75%. Um derivado palmitoilado de AN1792 foi completamente não imunogénico quando administrado em PBS e proporcionou títulos modestos quando presente numa emulsão do tipo óleo-em-água com valores de GMT de 340 e 105 para a terceira e quarta recolhas de sangue. Os títulos de anticorpo mais elevados foram obtidos com adjuvante de Freund, com um pico de GMT de cerca de 87000, um valor praticamente 30 vezes superior ao valor de GMT das duas formulações seguintes mais potentes, MPL e dose elevada de AN1792/alum.

Os adjuvantes mais promissores identificados neste estudo foram o MPL e o alum. Destes dois, o MPL parece ser preferível, uma vez que foi necessária uma dose de

antigénio 10 vezes inferior para proporcionar a mesma resposta de anticorpo obtida com alum. A resposta pode ser aumentada por meio do aumento da dose de antigénio e/ou de adjuvante e por meio da optimização do regime de optimização. A emulsão de tipo óleo-em-água foi um adjuvante bastante fraco para AN1792 e a adição de uma emulsão de tipo óleo-em-água ao adjuvante MPL fez diminuir a actividade adjuvante intrínseca do MPL por si só.

2. Níveis de A β no cérebro

Decorridas cerca de 14 semanas, anestesiou-se profundamente as cobaias, retirou-se o fluido cerebrospinal e excisou-se os cérebros a partir dos animais para um subconjunto dos grupos, aqueles imunizados com adjuvante de Freund (grupo 2), MPL (grupo 5), alum com uma dose elevada de 300 μ g de AN1792 (grupo 10) e o grupo de controlo imunizado com PBS (grupo 3)

Para medir o nível de péptido A β , dissecou-se um hemisfério e preparou-se homogenados das regiões do hipocampo, do córtex e do cerebelo em guanidina 5 M. Estes foram diluídos e quantificados por comparação com um conjunto de diluições de proteína A β convencional para concentrações conhecidas, num formato ELISA. Os níveis de proteína A β no hipocampo, no córtex e no cerebelo foram bastante semelhantes para os quatro grupos apesar do intervalo amplo de respostas do anticorpo para A β obtidos por estas formulações. Foram medidos níveis médios de A β de cerca de 25 ng/g no hipocampo, 21 ng/g no córtex e 12 ng/g no cerebelo. Assim a presença de um título elevado de anticorpo em circulação para A β durante praticamente três meses para alguns destes animais não alterou os níveis de

A β totais nos seus cérebros. Os níveis de A β no CSF também foram bastante semelhantes entre os grupos. A ausência de um efeito notório da imunização com AN1792 sobre A β endógeno indica que a resposta imune está focada nas formações patológicas de A β .

VIII. Resposta imune para diferentes adjuvantes em murganhos

Utilizou-se murganhos fêmeas da estirpe Swiss Webster, com seis semanas de idade, para este estudo, utilizando 10 a 13 animais por grupo. As imunizações foram administradas nos dias 0, 14, 28, 60, 90 e 20, por via subcutânea numa dose com um volume de 200 μ L. Utilizou-se PBS como tampão para todas as formulações. Recolheu-se sangue dos animais sete dias após cada imunização, com início após a segunda dose, para análise dos títulos de anticorpo pelo método ELISA. No quadro 9 encontra-se descrito o regime de tratamento para cada grupo.

Quadro 9

Concepção experimental do estudo 010					
Grupo	N ^a	Adjuvante	Dose	Antigénio	Dose (μ g)
1	10	MPL	12,5 μ g	AN1792	33
2	10	MPL	25 μ g	AN1792	33
3	10	MPL	50 μ g	AN1792	33
4	13	MPL	125 μ g	AN1792	33
5	13	MPL	50 μ g	AN1792	150
6	13	MPL	50 μ g	AN1528	33
7	10	PBS		AN1792	33
8	10	PBS		nenhum	

Concepção experimental do estudo 010					
Grupo	N ^a	Adjuvante	Dose	Antigénio	Dose (μg)
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	QS-21	5 μg	AN1792	33
14	10	QS-21	10 μg	AN1792	33
15	10	QS-21	25 AN1792	AN1792	33
16	13	QS-21	25 AN1792	AN1792	150
17	13	QS-21	25 AN1792	AN1528	33
18	13	QS-21 + MPL	25 μg /50 μg	AN1792	33
19	13	QS-21 + Alum	25 μg /2 mg	AN1792	33
<p>Notas:</p> <p>^a número de murganhos em cada grupo no início da experiência.</p> <p>^b os adjuvantes são apresentados. O tampão utilizado para todos estas formulações foi PBS. Para o grupo 8, não foram utilizados adjuvante e antigénio.</p>					

No quadro 10 seguinte estão apresentados os títulos de anticorpo contra A β 42 para cada grupo, determinados por ELISA.

Quadro 10

Média geométrica dos títulos de anticorpo					
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	12871
4	1278	20791	14368	20097	25631
5	3288	26242	13229	9315	23742
6	61	2536	2301	1442	4504
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

O quadro mostra que os títulos mais elevados foram obtidos para os grupos 4, 5 e 18, nos quais os adjuvantes foram 125 µg de MPL, 50 µg de MPL e QS-21 mais MPL.

IX. Eficácia terapêutica de diferentes adjuvantes

Efectuou-se um estudo sobre a eficácia terapêutica em murganhos transgênicos PDAPP com um conjunto de adjuvantes adequados para utilização em seres humanos, para se determinar a sua aptidão para potenciar respostas imunes para A β e para induzir a limpeza imuno-mediada de depósitos amilóides no cérebro.

Utilizou-se cento e oitenta murganhos transgênicos PDAPP heterozigóticos, machos e fêmeas, com 7,5 a 8,5 meses de idade, provenientes de Charles River Laboratories. Distribuiu-se os murganhos em nove grupos, os quais continham entre 15 e 23 animais por grupo, para serem imunizados com AN1792 ou com AN1528 combinados com diversos adjuvantes. Distribuiu-se os animais de modo a coincidir, dentro de cada grupo, o género, a idade e o grau de parentesco dos animais tão próximo quanto possível. Como adjuvantes refere-se alum, MPL e QS-21, cada um dos quais combinados com ambos os antigénios, e o adjuvante de Freund (FA) combinado apenas com AN1792. Um grupo suplementar foi imunizado com AN1792 formulado em tampão PBS mais o conservante timerosal na ausência de adjuvante. Um nono grupo foi imunizado com PBS por si só, como controlo negativo.

Preparação de péptidos A β agregados: péptidos A β 1-40 humanos (AN1528; California Peptides Inc., Napa, CA; lote ME0541) e A β 1-42 humanos (AN1792; California Peptides Inc., lote ME0439) foram solubilizados no momento para a preparação de cada conjunto de injeções a partir de pós liofilizados que tinham sido armazenados desidratados a -20° C. Para este fim, adicionou-se 2 mg de péptido a 0,9 mL de água desionizada e centrifugou-se a mistura para se obter uma solução ou suspensão relativamente uniforme. O

AN1528 era solúvel neste passo, ao contrário do AN1792. Adicionou-se então uma alíquota de 100 µL de 10X PBS (1X PBS: NaCl 0,15 M, fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,5), instante esse no qual o péptido AN1528 começou a precipitar. Centrifugou-se novamente as suspensões e manteve-se a incubar de um dia para o outro a 37°C, para utilização no dia seguinte.

Para a preparação de doses de formulação com alum (grupos 1 e 5), adicionou-se o péptido Aβ em PBS a Al-hidrogel (gel de hidróxido de alumínio aquoso a 2%, Sargeant, Inc., Clifton, NJ) para se obter concentrações de 100 µg de péptido Aβ por 1 mg de alum. Adicionou-se 10X PBS até um volume final de dose de 200 µL em 1X PBS. Misturou-se então suavemente a suspensão aproximadamente durante 4 horas à temperatura ambiente antes da injeção.

Para se preparar doses de formulações com MPL (grupos 2 e 6), adicionou-se pó liofilizado (Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, MT; lote 67039-E0896B) a 0,2% de trietilamina aquosa até uma concentração final de 1 mg/mL e centrifugou-se. Aqueceu-se a mistura até 65°C-70°C durante 30 segundos para se criar uma suspensão uniforme de micelas ligeiramente opaca. Armazenou-se a solução a 4°C. Para cada conjunto de injeções, misturou-se 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 silicato de boro, imediatamente antes de se utilizar.

Para se preparar doses de formulações com QS-21 (grupos 3 e 7), adicionou-se pó liofilizado (Aquila, Framingham, MA; lote A7018R) a PBS, pH 6,6-6,7, até uma concentração final de 1 mg/mL e centrifugou-se. Armazenou-se a solução a -20°C. Para cada conjunto de injeções,

misturou-se 100 µg de péptido por dose em 50 µL de PBS, 25 µg de QS-21 por dose em 25 µL de PBS e 125 µL de PBS por dose num tubo de silicato de boro, imediatamente antes de se utilizar.

Para se preparar doses de formulações com adjuvante de Freund (grupo 4), preparou-se uma emulsão, a 1:1 (vol:vol), de 100 µg de AN1792 em 200 µL PBS com adjuvante completo de Freund (CFA) num volume final de 400 µL, para a primeira imunização. Para imunizações subsequentes, preparou-se uma emulsão de antigénio de um modo semelhante com adjuvante incompleto de Freund (IFA). Para as formulações que contêm os adjuvantes alum, MPL ou QS-21, combinou-se 100 µg por dose de AN1792 ou de AN1528 com alum (1 mg por dose) ou com MPL (50 µg por dose) ou com QS-21 (25 µg por dose) para um volume final de 200 µL em PBS e administrou-se por inoculação subcutânea nas costas entre as omoplatas. Para o grupo que recebeu FA, preparou-se uma emulsão, a 1:1 (vol:vol), de 100 µg de AN1792 com adjuvante completo de Freund (CFA) para um volume final de 400 µL e administrou-se por via intraperitoneal para a primeira imunização, seguindo-se um reforço com a mesma quantidade de imunogénio em adjuvante incompleto de Freund (IFA) para as cinco doses subsequentes. Para o grupo que recebeu AN1792 na ausência de adjuvante, combinou-se 10 µg de AN1792 com 5 µg de timerosal para um volume final de 50 µL em PBS e administrou-se por via subcutânea. O nono grupo de controlo recebeu apenas 200 µL de PBS, administrados por via subcutânea. As imunizações foram administradas num regime bissemanal para as primeiras três doses e depois num regime mensal nos dias 0, 16, 28, 56, 85 e 112. Recolheu-se sangue dos animais seis a sete dias após cada imunização, com

início após a segunda dose, para se determinar os títulos de anticorpo. Submeteu-se os animais a eutanásia aproximadamente uma semana após a dose final. Os resultados foram determinados por meio de um ensaio ELISA dos níveis de A β e de APP no cérebro e por meio de avaliação imunohistoquímica da presença de placas amilóides em secções do cérebro. Além disso, determinou-se os títulos de anticorpo específico de A β , e das respostas proliferativas dependentes de A β e de respostas de citocinas.

O quadro 10 mostra que os títulos mais elevados de anticorpo para A β 1-42 foram obtidos com FA e AN1792, os títulos que apresentaram um pico após a quarta imunização (pico GMT: 75,386) e depois diminuíram em 59% após a sexta imunização final. O título médio do pico obtido por MPL com AN1792 foi 62% inferior ao obtido com FA (pico GMT: 28867) e também foi atingido mais cedo no esquema de imunização, após 3 doses, seguindo-se uma diminuição para 28% do valor do pico após a sexta imunização. O título médio do pico para QS-21 combinado com AN1792 (GMT: 1511) foi cerca de 5 vezes inferior ao obtido com MPL. Além disso, a cinética da resposta foi mais lenta, uma vez que foi necessária uma imunização suplementar para se atingir o pico de resposta. Os títulos obtidos por AN1792 ligado a alum foram ligeiramente superiores aos obtidos com QS-21 e a resposta cinética foi mais rápida. Para AN1792 administrado em PBS com timerosal a frequência e valor dos títulos foi muito ligeiramente superior do que os obtidos por PBS por si só. Os títulos de pico obtidos com MPL e AN1528 (pico GMT 3099) foram cerca de 9 vezes inferiores aos obtidos com AN1792. O AN1528 ligado a alum foi bastante pouco imunogénico, apresentando títulos baixos obtidos apenas em alguns

animais. Não foram observadas respostas de anticorpo nos animais de controlo imunizados com PBS por si só.

Quadro 11

Média geométrica dos títulos de anticorpo ^a					
Semana da recolha 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 (19/21)	572 (18/21)
MPL/AN1792	6241 (21/21)	28867 (21/21)	11242 (21/21)	5665 (20/20)	8204 (20/20)
QS- 21/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)
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 (20/20)	3099 (20/20)
QS- 21/AN1528	29 (1/22)	221 (13/22)	51 (4/22)	820 (20/22)	2994 (21/22)
PBS e 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:					
^a Média geométrica do título de anticorpo medido contra A β 1-42					
^b Número de respostas por grupo					

Os resultados do tratamento de AN1792 ou de AN1528 com diversos adjuvantes, ou com timerosal, sobre a carga amilóide cortical em murganhos com 12 meses de idade, determinados por ELISA, são apresentados na fig. 15. Em murganhos PDAPP de controlo com PBS, o nível mediano de A β total no córtex aos 12 meses foi de 1817 ng/g. Foram observados níveis surpreendentemente reduzidos de A β em murganhos tratados com AN1792 mais CFA/IFA, AN1792 mais alum, AN1792 mais MPL e QS-21 mais AN1792. A redução atingiu significância estatística ao nível de $p < 0.05$ apenas para AN1792 mais CFA/IFA. No entanto, conforme apresentado nos exemplos I e III, os efeitos de imunização na redução de dos níveis de A β foi substancialmente superior em murganhos com 15 meses e 18 meses de idade. Assim, é possível prever que formulações suplementares, em particular composições de AN1792 mais alum, AN1792 mais MPL e AN1792 mais QS-21, irão proporcionar resultados positivos no tratamento de murganhos mais idosos. Pelo contrário, o AN1792 mais o conservante timerosal apresentou um nível mediano de A β praticamente idêntico aos dos murganhos tratados com PBS. Fora obtidos resultados semelhantes quando se efectuou a comparação dos níveis corticais de A β 42. O nível mediano de A β 42 nos controlos de PBS foi de 1624 ng/g. Foram observados níveis medianos extremamente reduzidos de 403, 1149, 620 e 714 para murganhos tratados com AN1792 mais CFA/IFA, AN1792 mais alum, AN1792 mais MPL e AN1792 mais QS-21, respectivamente, em que a redução atingiu uma significância estatística ($p = 0,05$) para o grupo de tratamento com AN1792 e CFA/IFA. O nível mediano nos murganhos tratados com AN1792 e timerosal foi de 1619 ng/g de A β 42.

X. Análise de toxicidade

Foram recolhidos tecidos para um exame histopatológico no final dos estudos descritos nos exemplos II, III e VII. Além disso, efectuou-se hematologia e química clínica em amostras de sangue do final provenientes dos exemplos III e VI. Avaliou-se a maior parte dos órgãos principais, incluindo cérebro, pulmão, linfóide, gastrointestinal, fígado, rim, glândulas adrenais e gónadas. Embora tenham sido observadas lesões esporádicas nos animais do estudo, não foram verificadas diferenças óbvias, quer em tecidos afectados quer na gravidade das lesões, entre os animais tratados com AN1792 e os não tratados. Não foram observadas lesões histopatológicas únicas em animais imunizados com AN1528 em comparação com os animais tratados com PBS ou não tratados. Também não foram observadas diferenças no perfil químico clínico entre os grupos de adjuvante e os animais tratados com PBS no exemplo VI. Embora tenham sido observados aumentos significativos em diversos dos parâmetros hematológicos entre os animais tratados com AN1792 e adjuvante de Freund no exemplo VI em relação aos animais tratados com PBS, este tipo de efeitos é esperado a partir de tratamentos com adjuvante de Freund e da peritonite associada, não indicando quaisquer efeitos adversos do tratamento com AN1792. Embora não faça parte da avaliação toxicológica, examinou-se extensivamente a patologia do cérebro de murganhos PDAPP como parte de parâmetros de eficácia. Não foram observados sinais efeitos adversos associados ao tratamento na morfologia do cérebro para qualquer estudo. Estes resultados indicam que o

tratamento com AN1792 é bem tolerado e pelo menos praticamente isento de efeitos secundários.

XI. Tratamento terapêutico com anticorpos anti-A β

As experiências descritas nesta secção foram efectuadas para se testar a aptidão de diversos anticorpos monoclonais e policlonais contra A β para inibir a acumulação de A β no cérebro de murganhos transgénicos heterozigóticos.

A. Estudo 1

1. Concepção do estudo

Utilizou-se sessenta murganhos transgénicos PDAPP heterozigóticos, machos e fêmeas, com 8,5 a 10,5 meses de idade, provenientes de Charles River Laboratory. Distribuiu-se os murganhos em seis grupos para serem tratados com diversos anticorpos dirigidos a A β . Distribuiu-se os animais de modo a coincidir, dentro de cada grupo, o género, a idade e o grau de parentesco dos animais tão próximo quanto possível. Conforme apresentado no quadro 12, os anticorpos incluíam quatro anticorpos monoclonais específicos de A β de murino, 2H3 (dirigido aos resíduos 1-12 de A β), 10D5 (dirigido aos resíduos 1-16 de A β), 266 (dirigido aos resíduos 13-28 de A β , o qual se liga a AN1792 monomérico mas não se liga a AN1792 agregado), 21F12 (dirigido aos resíduos 33-42 de A β). Tratou-se um quinto grupo com uma fracção de anticorpo policlonal específica de A β (produzida por imunização com AN1792 agregado). Ao controlo negativo foi administrado o diluente, PBS, por si só sem anticorpo.

Os anticorpos monoclonais foram injectados com uma dose de cerca de 10 mg/kg (assumindo que os murganhos têm um peso de 50 g). As injeções foram administradas por via intraperitoneal a cada sete dias em média para manter os títulos anti-A β superiores a 1000. Embora tenham sido medidos títulos inferiores para o mAb 266, uma vez que não se liga bem ao AN1792 agregado utilizado como antigénio de captura no ensaio, foi mantido o mesmo regime de dosagem para este grupo. O grupo ao qual era administrado o anticorpo monoclonal 2H3 foi descontinuado durante as primeiras três semanas, uma vez que o anticorpo era retirado demasiadamente rápido *in vivo*. Recolheu-se sangue dos animais antes de cada dosagem, para se determinar os títulos de anticorpo. Manteve-se o tratamento ao longo de um período de seis meses para um total de 196 dias. Os animais foram submetidos a eutanásia uma semana após a dose final.

Quadro 12

CONCEPÇÃO EXPERIMENTAL DO ESTUDO 006				
Grupo de tratamento	N ^a	Anticorpo do tratamento	Especificidade do anticorpo	Isotipo do anticorpo
1	9	nenhum (PBS por si só)	NA ^b	NA
2	10	policlonal	A β 1-42	Misto
3	0	mAb ^c 2H3	A β 1-12	IgG1
4	8	mAb 10D5	A β 1-16	IgG1
5	6	mAb 266	A β 13-28	IgG1

CONCEPÇÃO EXPERIMENTAL DO ESTUDO 006				
Grupo de tratamento	N ^a	Anticorpo do tratamento	Especificidade do anticorpo	Isotipo do anticorpo
6	8	mAb 21F12	A β 33-42	IgG2a
<p>Notas:</p> <p>^a Número de murganhos no final da experiência. Todos os grupos iniciaram com 10 animais por grupo.</p> <p>^b NA: não aplicável</p> <p>^c mAb: anticorpo monoclonal</p>				

2. Materiais e métodos

a. Preparação dos anticorpos

Preparou-se o anticorpo policlonal anti-A β a partir de sangue recolhido de dois grupos de animais. O primeiro grupo era constituído por 100 murganhos fêmeas da estirpe Swiss Webster, com 6 a 8 semanas de idade. Foram imunizados nos dias 0, 15 e 29 com 100 μ g de AN1792 combinado com CFA/IFA. Administrou-se uma quanta injeção no dia 36 com metade da dose de AN1792. Exsanguinou-se os animais, após sacrifício ao dia 42, preparou-se soro e agrupou-se o soro para se obter um total de 64 mL. O segundo grupo era constituído por 24 murganhos fêmeas, isogénicos com os murganhos PDAPP, mas não transgénicos para o gene APP humano, com 6 a 9 semanas de idade. Foram imunizados nos dias 0, 14, 28 e 56 com 100 μ g de AN1792 combinado com CFA/IFA. Também se exsanguinou estes animais, após sacrifício ao dia 63, preparou-se o soro e agrupou-se o soro para se obter um total de 14 mL. Agrupou-se dois lotes de soro. Purificou-se a fracção de anticorpo utilizando duas rondas sequenciais de precipitação com sulfato de

amónio saturado a 50%. Submeteu-se o precipitado final a diálise contra PBS e testou-se quanto a endotoxinas. O nível de endotoxinas era inferior a 1 EU/mg.

Preparou-se os anticorpos monoclonais anti-A β a partir de fluidos ascíticos. Em primeiro lugar, efectuou-se a deslipidação do fluido por meio da adição de dextrano-sulfato de sódio concentrado a fluido ascítico arrefecido com gelo por agitação em gelo até se obter uma concentração final de 0,238%. Adicionou-se então CaCl₂ concentrado sob agitação para se atingir uma concentração final de 64 mM. Centrifugou-se esta solução a 10000 x g e deitou-se foram os grânulos. Agitou-se o sobrenadante em gelo e adicionou-se, gota a gota, um volume igual de sulfato de amónio saturado. Centrifugou-se novamente a solução a 10000 x g e deitou-se fora o sobrenadante. Colocou-se novamente em suspensão os grânulos e submeteu-se a diálise contra Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,4 M, pH 7,5. Aplicou-se esta fracção a uma coluna de Sepharose FPLC 'Pharmacia' e efectuou-se a eluição com um gradiente inverso desde de NaCl desde 0,4 M até 0,275 M em Tris-HCl 20 mM, pH 7,5.

Identificou-se o pico do anticorpo por absorvância a 280 nm e agrupou-se as fracções adequadas. Caracterizou-se a preparação de anticorpo purificada por meio da medição da concentração de proteína utilizando o método BCA e da pureza utilizando SDS-PAGE. Também se testou o material agrupado quanto a endotoxinas. O nível de endotoxinas era inferior a 1 EU/mg. Para títulos inferiores a 100 foi atribuído arbitrariamente um valor de título de 25.

3. Níveis de A β e de APP no cérebro

Decorridos cerca de 6 meses de tratamento com diversas preparações de anticorpos anti-A β , removeu-se os cérebros de animais, após perfusão com soluto salino. Preparou-se um hemisfério para análise imuno-histoquímica e utilizou-se o segundo para a quantificação dos níveis de A β e de APP. Para se determinar as concentrações das diversas formas do péptido β -amilóide e da proteína precursora amilóide (APP), dissecou-se o hemisfério e preparou-se homogenados das regiões do hipocampo, do córtex e do cerebelo em guanidina 5 M. Efectuou-se diluições em série e quantificou-se o nível de péptido amilóide ou de APP por comparação com conjuntos de diluições de padrões do péptido A β ou de APP para concentrações conhecidas, num ensaio ELISA.

Nos quadros 11, 12 e 13, são apresentados respectivamente os níveis de A β total e de A β 1-42 conforme determinados por ELISA em homogenados do córtex e do hipocampo e o nível total de A β no cerebelo. A concentração mediana de A β total para o grupo de controlo, inoculado com PBS, era 3,6 vezes superior no hipocampo do que verificada no córtex (mediana de 63389 ng/g de tecido do hipocampo comparativamente com 17818 ng/g para o córtex). O nível mediano no cerebelo para o grupo de controlo (30,6 ng/g de tecido) era mais do que 2000 vezes inferior ao do hipocampo. Estes níveis são semelhantes aos anteriormente descritos para murganhos transgénicos PDAPP heterozigóticos desta idade (Johnson-Woods *et al.*, 1997).

Para o córtex, um grupo de tratamento apresentava um nível mediano de A β , medido como A β 1-42, que era significativamente diferente do obtido para o grupo de controlo ($p < 0,05$), aqueles animais que recebiam o anticorpo policlonal anti-A β , conforme ilustrado no quatro

13. O nível mediano de A β 1-42 foi reduzido em 65% em comparação com o controlo para este grupo de tratamento. Os níveis medianos de A β 1-42 também foram significativamente reduzidos em 55% em comparação com o controlo de um grupo suplementar de tratamento, cujos animais foram administrados com doses de mAb 105D (p = 0,0433).

Quadro 13

CÓRTEX									
Grupo de tratamento	N ^a	Medianas						Médias	
		A β Total			A β 42			A β Total	A β 42
		valor ^b ELISA	valor ^c p	% alteração	valor ELISA	valor p	% alteração	valor ELISA	valor ELISA
PBS	9	17818	NA ^d	NA	13802	NA	NA	16150+/- 7456'	12621 +/- 5738
Policlonal anti- A β 42	10	6160	0,0055	-65	4892	0,0071	-65	5912 +/- 4492	4454 +/- 3347
mAb 10D5	8	7915	0,1019	-56	6214	0,0433	-55	9695 +/- 6929	6943 +/- 3351
mAb 266	6	9144	0,1255	-49	8481	0,1255	-39	9204 +/- 9293	7489 +/- 6921
mAb 21F12	8	15158	0,2898	-15	13578	0,7003	-2	12481 +/- 7082	11005 +/- 6324
Notas:									
a. Número de animais por grupo no final da experiência									
b. ng/g no tecido									
c. análise de Mann Whitney									
d. NA: não aplicável									
e. desvio padrão									

No hipocampo, a percentagem mediana de redução de A β total associada ao tratamento com anticorpo policlonal anti-A β (50%, p = 0,0055) não foi superior à observada no córtex (65%) (quadro 14). No entanto, a magnitude absoluta

da redução foi praticamente 3 vezes superior no hipocampo em comparação com a do córtex, observando-se uma redução total de 31683 ng/g de tecido no hipocampo versus 11658 ng/g de tecido no córtex. Quando medida como o nível da forma mais amiloidogénica de A β , A β 1-42, em vez de A β total, a redução alcançada pelo anticorpo policlonal foi significativa ($p = 0,0025$). Os níveis medianos em grupos tratados com o mAb 10D5 e 266 foram reduzidos em 33% e 21%, respectivamente.

Quadro 14

HIPO CAMPO									
Grupo de tratamento	N ^a	Medianas						Médias	
		A β Total			A β 42			A β Total	A β 42
		valor ^b ELISA	valor ^c p	% alteração	valor ELISA	valor p	% alteração	valor ELISA	valor ELISA
PBS	9	63389	NA ^d	NA	54429	NA	NA	58351 +/- 13308 ^e	52801 +/- 14701
Policlonal anti- A β 42	10	31706	0,0055	-50	27127	0,0025	-50	30058 +/- 22454	24853 +/- 18262
mAb 10D5	8	46779	0,0675	-26	36290	0,0543	-33	44581 +/- 18632	36465 +/- 17146
mAb 266	6	48689	0,0990	-23	43034	0,0990	-21	36419 +/- 27304	32919 +/- 25372
mAb 21F12	8	51563	0,7728	-19	47961	0,8099	-12	57327 +/- 28927	50305 +/- 23927

Notas:

- Número de animais por grupo no final da experiência
- ng/g no tecido
- análise de Mann Whitney
- NA: não aplicável
- desvio padrão

Também se determinou o A β total no cerebelo (quadro 15). Os grupos que receberam doses de anticorpo policlonal anti-A β e de anticorpo 266 apresentaram reduções significativas dos níveis de A β total (43% e 46%, $p = 0,0033$ e $p = 0,0184$, respectivamente) e o grupo tratado com anticorpo 10D5 apresentou uma redução praticamente significativa (29%, $p = 0,0675$).

Quadro 15

CEREBELO					
Grupo de tratamento	N ^a	Medianas			Médias
		A β Total			A β Total
		valor ^b ELISA	valor ^c p	% alteração	valor ELISA
PBS	9	30,64	NA ^d	NA	40,00 +/- 31,89 ^e
Policlonal anti- A β 42	10	17,61	0,0033	-43	18,15 +/- 4,36
mAb 10D5	8	21,68	0,0675	-29	27,29 +/- 19,43
mAb 266	6	16,59	0,0184	-46	19,59 +/- 6,59
mAb 21F12	8	29,80	>0,9999	-3	32,88 +/- 9,90
Notas:					
a. Número de animais por grupo no final da experiência					
b. ng/g no tecido					
c. análise de Mann Whitney					
d. NA: não aplicável					
e. desvio padrão					

A concentração de APP também foi determinada por ELISA no córtex e no cerebelo a partir de murganhos tratados com anticorpo, tratados com PBS e de controlo. Foram utilizados dois ensaios de APP diferentes. O primeiro, designado por APP- α /FL, reconhece APP- α (α , forma segregada a partir de APP que foi clivada na sequência de A β) e formas de comprimento completo (FL) de APP, ao passo que o segundo apenas reconhece APP- α . Ao contrário da diminuição de A β associada ao tratamento num subconjunto de grupos de tratamento, os níveis de APP mantiveram-se praticamente inalterados para todos os animais tratados em comparação

com os animais de controlo. Estes resultados indicam que a imunização com anticorpos A β esgotam ou A β sem esgotar a APP.

Resumidamente, os níveis de A β foram significativamente reduzidos no córtex, no hipocampo e no cerebelo em animais tratados com o anticorpo policlonal preparado contra AN1792. Num menor grau, os anticorpos monoclonais para a região do terminal amino de A β 1-42, especificamente os aminoácidos 1-16 e 13-28, também demonstraram efeitos significativos do tratamento.

4. Análise histoquímica

A morfologia de placas A β imuno-reativas em subconjuntos de cérebros provenientes de murganhos nos grupos de tratamento com PBS, anticorpo policlonal A β 42, anticorpo 21F12, anticorpo 266 e anticorpo 10D5 foi qualitativamente comparada com a de estudos anteriores, nos quais foram utilizados procedimentos de imunização convencionais com A β 42.

A maior alteração quer em termos de extensão quer em termos de aparência das placas amilóides ocorreu nos animais imunizados com o anticorpo policlonal A β 42. A redução da carga amilóide, a morfologia de placas erodidas e a imuno-reatividade de A β associada a células foram extremamente semelhantes aos efeitos produzidos pelo procedimento de imunização convencional. Estas observações comprovam os resultados ELISA, nos quais foram obtidas reduções significativas de A β total e de A β 42 por meio da administração do anticorpo policlonal A β 42.

Para avaliações qualitativas semelhantes, as placas amilóides para o grupo 105D também foram reduzidas em

número e em aparência, com algumas evidências de imunoreactividade de A β associada a células. Não foram observadas diferenças principais quando se comparou os grupos 21F12 e 266 com os controlos de PBS.

5. Determinação dos títulos de anticorpo

Recolheu-se sangue de um subconjunto de três murganhos seleccionados aleatoriamente a partir de cada grupo, imediatamente antes de cada inoculação intraperitoneal, para um total de 30 recolhas de sangue. Determinou-se os títulos de anticorpo, como anticorpo ligado a A β 1-42, utilizando um método de sanduíche ELISA com placas de multicavidades de plástico revestidas com A β 1-42, conforme descrito mais minuciosamente na secção Materiais gerais e métodos. Nas figs. 16 a 18 estão apresentados os títulos médios para cada recolha de sangue para o anticorpo policlonal e para os anticorpos monoclonais 10D5 e 21F12, respectivamente. Os títulos possuíam um valor médio de cerca de 1:1000 ao longo deste período para a preparação de anticorpo policlonal e um valor ligeiramente superior a este para os animais tratados com 10D5 e 21F12.

6. Respostas linfoproliferativas

Determinou-se a linfoproliferação dependente de A β utilizando células de baço colhidas oito dias após a infusão final de anticorpo. As células colhidas no momento, 10^5 por cavidade, foram mantidas em cultura durante 5 dias na presença de A β 1-40 com uma concentração de 5 μ M, para estimulação. Como controlo positivo, manteve-se em cultura células suplementares com o mitogénio de células T, PHA, e

como controlo negativo, manteve-se em cultura células às quais não se tinha adicionado péptido.

Os esplenócitos provenientes de murganhos PDAPP idosos imunizados passivamente com diversos anticorpos anti-A β foram estimulados *in vitro* com AN1792 e mediu-se as respostas proliferativas e de citocinas. A finalidade destes ensaios consistia em determinar se uma imunização passiva facilitava a apresentação de antígeno, e assim estimular as respostas de células T específicas para AN1792. Não foram observadas respostas proliferativas ou de citocinas específicas para AN1792 em murganhos imunizados passivamente com os anticorpos anti-A β .

B. Estudo 2

Num segundo estudo, repetiu-se o tratamento com anticorpo 10D5 e testou-se dois anticorpos anti-A β suplementares, os anticorpos monoclonais 3D6 (A β ₁₋₅) e 16C11 (A β ₃₃₋₄₂). Os grupos de controlo receberam PBS ou um anticorpo semelhante ao isotipo irrelevante (TM2a). Os murganhos eram mais velhos (heterozigóticos com 11,5 a 12 meses de idade) do que no estudo anterior; sendo a restante concepção experimental idêntica. Novamente, decorridos seis meses de tratamento, o anticorpo 10D5 reduziu a carga de placas num valor superior a 80% em relação aos controlos de PBS e ou de anticorpo semelhante ao isotipo ($p = 0,003$). Um dos outros anticorpos contra A β , o 3D6, foi igualmente eficaz, produzindo uma redução de 86% ($p = 0,003$). Pelo contrário, o terceiro anticorpo contra o péptido, o 16C11, não conseguiu demonstrar qualquer efeito sobre a carga de placas. Foram obtidas conclusões semelhantes com as medições ELISA de A β 42. Estes resultados demonstram que uma

resposta de anticorpo contra o péptido A β , na ausência de imunidade de células T, é suficiente para diminuir a deposição amilóide em murganhos PDAPP, mas que nem todos os anticorpos anti-A β são eficazes. Os anticorpos dirigidos aos epítomos que compreendem os aminoácidos 1-5 ou 3-7 de A β são particularmente eficazes.

Estes estudos demonstram que a administração passiva de anticorpos contra A β reduz a extensão da deposição de placas em modelos de murganhos da doença de Alzheimer. Quando realizados para concentrações no soro modestas (25 a 70 $\mu\text{g/mL}$), os anticorpos conseguem aceder ao SNC em níveis suficientes para parar as placas β -amilóides. A entrada do anticorpo no SNC não foi devida a uma permeabilidade anormal da barreira hemato-encefálica, uma vez que não houve um aumento na permeabilidade vascular, conforme determinado pelo azul de Evans em murganhos PDAPP. Além disso, a concentração do anticorpo no parênquima do cérebro de murganhos PDAPP idosos era idêntico ao de murganhos não transgênicos, representando 0,1% da concentração de anticorpo no soro (independentemente do isotipo).

C. Estudo 3: monitorização da ligação do anticorpo

Para se determinar se os anticorpos contra A β poderiam estar a actuar directamente no SNC, foram examinados cérebros retirados de murganhos com perfusão de soluto salino no final do exemplo XII, quando à presença dos anticorpos administrados por via periférica. Expôs-se secções de cérebro criostáticas não fixadas a um reagente fluorescente contra imunoglobulina de murganho (IgG-Cy3 de cabra anti-murganho). As placas nos cérebros dos grupos 10D5 e 3D6 estavam fortemente contaminadas com o anticorpo,

não tendo sido observadas manchas para o grupo 16C11. Para se identificar a extensão total da deposição de placas, efectuou-se, em primeiro lugar, a imuno-reação de secções em série de cada cérebro com um anticorpo anti-A β e depois com um reagente secundário. Os anticorpos 10D5 e 3D6, conseguiram aceder à maior parte das placas no SNC. A carga de placas foi significativamente reduzida nestes grupos de tratamento em comparação com o grupo 16C11. Estes dados indicam que os anticorpos administrados por via periférica podem penetrar o SNC, no qual podem iniciar directamente a limpeza amilóide. É provável que o anticorpo 16C11 também tenha tido acesso às placas, mas não foi capaz de se ligar às placas.

XII. Prevenção e tratamento de sujeitos humanos

Efectua-se um ensaio de fase 1 de dose individual para se determinar a segurança em seres humanos. Administra-se um agente terapêutico em doses crescentes a pacientes diferentes, com início a cerca de 0,01, o nível previsto de eficácia, e aumentando por um factor de 3 até se atingir um nível cerca de 10 vezes a dosagem eficaz em murganhos.

Efectua-se um ensaio de fase II para se determinar a eficácia terapêutica. São seleccionados pacientes com doença de Alzheimer inicial a média, definida utilizando os critérios da 'Alzheimer's disease and Related Disorders Association' (ADRDA) para uma DA provável. Os pacientes adequados apresentaram um resultado no intervalo de 12 a 26 no 'Mini-Mental State Exam' (MMSE). Um outro critério de selecção foram os pacientes com uma probabilidade maior de sobreviver ao longo do estudo e a ausência de complicações, tais como a utilização simultânea de medicamentos que

possam interferir. As avaliações da linha de base da função do paciente são efectuadas utilizando medições psicométricas clássicas, tais como MMSE e ADAS, que é uma escala compreensiva para a avaliação em pacientes do estado e da função da doença de Alzheimer. Estas escalas psicométricas proporcionam uma medida da progressão da doença de Alzheimer. Também é possível utilizar escalas adequadas de qualidade de vida para monitorizar o tratamento. A progressão da doença também pode ser monitorizada por MRI. Também é possível monitorizar os perfis sanguíneos dos pacientes, incluindo ensaios de respostas de anticorpos e de células T específicos de imunogénios.

Após as medições da linha de base, começa a ser administrado o tratamento aos pacientes. São distribuídos aleatoriamente e tratados com agente terapêutico ou com placebo num ensaio cego. Os pacientes são monitorizados pelo menos a cada seis meses. Determina-se a eficácia em termos de uma redução significativa da progressão de um grupo de tratamento em relação ao grupo de placebo.

Efectua-se um segundo ensaio de fase II para avaliar a conversão de pacientes desde perda de memória inicial não associada à doença de Alzheimer, por vezes designada por deficiência de memória associada à idade (AAMI) ou deficiência cognitiva suave (MCI), até doença de Alzheimer provável, conforme definida pelos critérios de ADRDA. Os pacientes com um elevado risco de conversão para a doença de Alzheimer são seleccionados a partir de uma população não clínica através da pesquisa em populações de referência de sinais iniciais de perda de memória ou de outras dificuldades associadas a uma sintomatologia pré-Alzheimer, uma história familiar de doença de Alzheimer, factores de

risco genéticos, idade, sexo e outras características que prevêm um risco elevado para a doença de Alzheimer. São recolhidos os resultados da linha de base em métricas adequadas, incluindo o MMSE e o ADAS em conjunto com outras métricas concebidas para avaliar uma população mais normal. Estas populações de pacientes são divididas em grupos adequados, sendo efectuada a comparação do placebo com dosagens alternativas do agente. Estas populações são monitorizadas em intervalos de cerca de seis meses, em que os parâmetros para cada paciente consistem no facto de cada paciente se converter para doença de Alzheimer provável, tal como definido pelo critério da ADRDA, no final da observação.

XII. Materiais gerais e métodos

1. Determinação dos títulos de anticorpo

Recolheu-se sangue de murganhos fazendo um pequeno corte na veia da cauda e recolhendo cerca de 200 μ L de sangue para um tubo de microcentrifugação. Recolheu-se sangue de cobaias, rapando em primeiro lugar a área do jarrete posterior e depois utilizando uma agulha tamanho 18 para picar a veia metatársica e recolher o sangue para tubos de microcentrifugação. Deixou-se o sangue coagular durante uma hora à temperatura ambiente (TA), submeteu-se a um vórtice e depois centrifugou-se a 14000 x g durante 10 minutos para se separar os coágulos do soro. Transferiu-se então o soro para um tubo de microcentrifugação e armazenou-se a 4°C, até se titular.

Os títulos de anticorpo foram determinados por ELISA. Revestiu-se placas de microtitulação com 96 cavidades

(placas Costar EIA) com 100 μL de uma solução que continha 10 $\mu\text{g/mL}$ de A β 42 ou de SAPP ou de outros antigénios, conforme referido para cada ensaio individual, em tampão de revestimento de Well (fosfato de sódio 0,1 M, pH 8,5, 0,1% de azida de sódio) e manteve-se à temperatura ambiente de um dia para o outro. Aspirou-se as cavidades e adicionou-se soro às cavidades iniciando com uma diluição a 1/100 em diluente 'Specimen' (fosfato de sódio 0,014 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, 0,6% de albumina do soro de bovino, 0,05% de timerosal). Foram efectuadas sete diluições em série das amostras directamente nas placas em passos de 3 vezes até se atingir uma diluição final de 1/218700. Manteve-se as diluições a incubar nas cavidades das placas revestidas durante uma hora à temperatura ambiente. Lavou-se então as placas três vezes com PBS que continha 0,05% de Tween 20. O segundo anticorpo, um Ig de cabra anti-murghão conjugado com peroxidase de rábano (proveniente de Boehringer Mannheim), foi adicionado às cavidades como 100 μL de uma diluição 1/3000 em diluente 'Specimen' e foi mantido a incubar durante uma hora à temperatura ambiente. Lavou-se novamente as placas quatro vezes com PBS, Tween 20. Para o desenvolvimento do cromogénio, adicionou-se a cada cavidade 100 μL de 'Slow TMB' (3,3',5,5'-tetrametil-benzidina proveniente de Pierce Chemicals) e manteve-se a incubar durante 15 minutos à temperatura ambiente. Interrompeu-se a reacção por meio da adição de 25 μL de H_2SO_4 2 M. Mediu-se então a intensidade da cor em dispositivos moleculares Vmax a 450 nm-650 nm.

Os títulos foram definidos como sendo o recíproco da diluição de soro para se obter metade do valor máximo de DO. De um modo geral, o valor máximo de DO foi retirado a

partir da diluição inicial de 1/100, excepto para casos com títulos muito elevados, caso esse em que foi necessário utilizar uma diluição inicial mais elevada para se estabelecer o valor máximo de DO. No caso de o ponto de 50% estar compreendido entre duas diluições, efectua-se uma extrapolação linear para calcular o título final. Para se calcular as médias geométricas dos títulos de anticorpo, para 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. Removeu-se os baços, enxaguou-se duas vezes com 5 mL de PBS que continham 10% de soro fetal de bovino termicamente inactivado (PBS-FBS) e depois homogeneizou-se numa unidade Centricon 50° (Dako A/S, Denmark) em 1,5 mL de 1.5 ml PBS-FBS durante 10 segundo a 100 r.p.m. numa 'Medimachine' (Dako), seguindo-se a filtração através de uma malha de nylon com um tamanho de poros de 100 µm. Lavou-se os esplenócitos uma vez com 15 mL de PBS-FBS, depois granulou-se opor centrifugação a 200 x g durante 5 minutos. Submeteu-se as células sanguíneas vermelhas a citólise através da re-suspensão dos grânulos em 5 mL de tampão que continha NH_4Cl 0,15 M, KHCO_3 1 M, NaEDTA 0,1 M, pH 7,4, durante 5 minutos à temperatura ambiente. Lavou-se então os leucócitos conforme descrito antes. Manteve-se em cultura células de baço isoladas no momento (10^5 células por cavidade), em conjuntos em triplicado, em placas de microtitulação tratadas com tecido de cultura, de fundo em U e com 96 cavidades (Coming, Cambridge, MA) em meio RPMI 1640 (JRH Biosciences, Lenexa, KS) com suplemento de L-

glutamina 2,05 mM L, 1% de penicilina/estreptomicina e 10% de FBS termicamente inativado, durante 96 horas a 37°C. Também foram adicionados diversos péptidos A β , A β 1-16, A β 1-40, A β 1-42 ou a proteína de sequência inversa A β 40-1, em doses compreendidas entre 5 e 0,18 μ M, em quatro passos. Manteve-se em cultura as células em cavidades de controlo com concanavalina A (Con A) (Sigma, n°. de cat. C-5275, a 1 μ g/mL), na ausência da adição de proteína. As células foram estimuladas durante as 24 horas finais com 3H-timidine (1 Ci/cavidade, proveniente de Amersham Corp., Arlington Heights IL). Recolheu-se então as células para placas 'UniFilter' e efectuou-se a contagem num contador de cintilação de microplacas 'Top Count' (Packard Instruments, Downers Grove, IL). Os resultados são expressos em contagens por minuto (cpm) de radioactividade incorporada em macromoléculas insolúveis.

4. Preparação de tecidos de cérebro

Após a eutanásia, removeu-se os cérebros e preparou-se um hemisfério para a análise imuno-histoquímica, ao passo que se dissecou três regiões do cérebro (hipocampo, córtex e cerebelo) a partir do outro hemisfério e se utilizou para determinar a concentração de diversas proteínas A β e formas de APP, utilizando métodos ELISA específicos (Johnson Wood *et al.*, *supra*).

Os tecidos destinados a ensaios ELISA foram homogeneizados em 10 volumes de tampão guanidina arrefecido em gelo (guanidina 5,0 M-HCl, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0). Misturou-se os homogenados através de agitação suave utilizando 'Adams Nutator' (Fisher) durante três a quatro horas à temperatura ambiente, e depois armazenou-se a -

20°C, antes de se efectuar a quantificação de A β e de APP. Experiências anteriores tinham demonstrado que os analitos eram estáveis para estas condições de armazenamento, e que a proteína A β sintética (Bachem) podia ser quantitativamente recuperada quando estimulada em homogenados de tecidos de cérebro de controlo a partir de murganhos de ninhadas naturais (Johnson-Wood *et al.*, *supra*).

5. Determinação dos níveis de A β

Diluiu-se a 1:10 os homogenados de cérebro com diluente caseína arrefecido com gelo (0,25% de caseína, PBS, 0,05% de azida de sódio, 20 μ g/ml de aprotinina, EDTA 5 mM, pH 8,0, 10 μ g/mL de leupeptina) e depois centrifugou-se a 16000 x g durante 20 minutos a 4°C. Preparou-se os padrões de proteína A β sintética (aminoácidos 1-42) e os padrões de APP de modo a incluir guanidina 0,5 M e 0,1% de albumina do soro de bovino (BSA) na composição final. O método sanduíche ELISA de A β "total" utiliza o anticorpo monoclonal 266, específico para os aminoácidos 13-28 de A β (Seubert, *et al.*), como anticorpo de captura, e o anticorpo monoclonal 3D6 biotinilado, específico para os aminoácidos 1-5 de A β (Johnson-Wood, *et al.*), como anticorpo repórter. A anticorpo monoclonal 3D6 não reconhece a APP segregada ou a APP de comprimento completo, mas detecta apenas espécies de A β com um ácido aspártico no terminal amino. Este ensaio possui um limite inferior de sensibilidade de ~50 ng/mL (11 nM) e não apresenta inter-reactividade para a proteína A β endógena de murino para concentrações até 1 ng/ml (Johnson-Wood *et al.*, *supra*).

O método ELISA sanduíche específico para A β 1-42 utiliza o mAb 21F12, específico para os aminoácidos 33-42 de A β (Johnson-Wood, et al.), como anticorpo de captura. O mAb 3D6 biotinilado também é o anticorpo repórter neste ensaio, que apresenta um limite inferior de sensibilidade de cerca de 125 μ g/mL (28 μ M, Johnson-Wood et al.). Para o método de ELISA para A β , revestiu-se 100 μ L de mAb 266 (a 10 μ g/mL) ou mAb 21F12 (a 5 μ g/ml) em placas de imunoenaios com 96 cavidades (Costar), por meio de incubação de um dia para à temperatura ambiente. Removeu-se a solução por aspiração e bloqueou-se as cavidades por meio da adição de 200 μ L de 0,25% de albumina do soro humana em tampão PBS durante pelo menos 1 hora à temperatura ambiente. Removeu-se a solução bloqueadora e armazenou-se as placas desidratadas a 4°C, até serem utilizadas. Hidratou-se novamente as placas com tampão de lavagem [soluto salino tamponado com Tris (NaCl 0,15 M, Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5), mais 0,05% de Tween 20], antes da utilização. As amostras e os padrões foram adicionados em aliquotas em triplicado de 100 μ L por cavidade e depois manteve-se a incubar de um dia para o outro a 4°C. Lavou-se as placas pelo menos três vezes com tampão de lavagem entre cada passo do ensaio. Adicionou-se o mAb 3D6 biotinilado, diluído até 0,5 μ g/mL em tampão de ensaio de caseína (0,25% de caseína, PBS, 0,05% de Tween 20, pH 7,4), e manteve-se a incubar nas cavidades durante 1 hora à temperatura ambiente. Adicionou-se um conjugado de avidina-peroxidase de rábano (avidina-HRP proveniente de Vector, Burlingame, CA), diluído a 1:4000 em tampão de ensaio de caseína, às cavidades durante 1 hora à temperatura ambiente. Adicionou-se o substrato colorimétrico, 'Slow TMB-ELISA' (Pierce),

deixou-se reagir durante 15 minutos à temperatura ambiente e depois interrompeu-se a reacção enzimática por meio da adição de 25 μ L de H₂SO₄ 2 N. Quantificou-se o produto de reacção utilizando um dispositivo molecular Vmax, que media a diferença em absorvância a 450 nm e 650 nm.

6. Determinação dos níveis de APP

Foram utilizados dois ensaios de APP diferentes. O primeiro, designado por APP- α /FL, reconhece APP- α (α) e formas de comprimento completo (FL) de APP. O segundo ensaio é específico para APP- α . O ensaio APP- α /FL reconhece APP segregada, incluindo os primeiros 12 aminoácidos de A β . Uma vez que o anticorpo repórter (2H3) não é específico para o local de ligação α , que ocorre entre os aminoácidos 61-613 de APP695 (Esch et al., Science 248, 1122-1124 (1990)); este ensaio também reconhece APP de comprimento completo (APP-FL). Experiências preliminares utilizando anticorpos de APP imobilizados à cauda citoplásmica de APP-FL para esgotar de APP-FL os homogenados de cérebro sugerem que aproximadamente 30%-40% de APP- α /FL-APP seja FL (dados não apresentados). O anticorpo de captura para os ensaios de APP- α /FL e de APP- α é mAb 8E5, produzido contra os aminoácidos 444 a 592 da forma APP695 (Games et al., supra). O mAb repórter para o ensaio de APP- α /FL é o mAb 2H3, específico para os aminoácidos 597-608 de APP695 (Johnson-Wood et al., supra) e o ácido repórter para o ensaio de APP- α é um derivado biotinilado de mAb 16H9, produzido contra os aminoácidos 605 a 611 de APP. O limite inferior de sensibilidade para o ensaio de APP- α /FL é de cerca de 11 ng/mL (150 μ M) (Johnson Wood et al.) e o do ensaio específico para APP- α é de 22 ng/mL (0,3 nM). Para

ambos os ensaios de APP, revestiu-se mAb 8E5 sobre cavidades de placas EIA com 96 cavidades, conforme descrito antes, para mAb 266. Utilizou-se APP- α recombinante segregada, purificada, como padrão de referência para o ensaio de APP- α e para o ensaio APP- α /FL (Esch et al., *supra*). As amostras de homogenado de cérebro em guanidina 5 M foram diluídas a 1:10 em diluente 'Specimen' para ELISA (tampão fosfato 0,014 M, pH 7,4, 0,6% albumina do soro de bovino, 0,05% de timerosal, NaCl 0,5 M, 0,1% de NP40). Fora então diluídas a 1:4 em diluente 'Specimen' que continha guanidina 0,5 M. Centrifugou-se então os homogenados diluídos a 16000 x g durante 15 segundos à temperatura ambiente. Adicionou-se os padrões e as amostras de APP à placa, em aliquotas em duplicado, e manteve-se a incubar durante 1,5 horas à temperatura ambiente. Manteve-se a incubar o anticorpo repórter biotinilado 2H3 ou 16H9 com as amostras durante 1 hora à temperatura ambiente. Manteve-se a incubar estreptavidina-fosfatase alcalina (Boehringer Mannheim), diluída a 1:1000 em diluente 'Specimen', nas cavidades durante 1 hora à temperatura ambiente. Adicionou-se o substrato fluorescente, 4-metil-umbeliferil-fosfato para uma incubação durante 30 minutos à temperatura ambiente e leu-se as placas num fluorímetro 'Cytofluor™ 2350' (Millipore) para 365 nm de excitação e 450 nm de emissão.

7. Imuno-histoquímica

Fixou-se os cérebros durante três dias a 40°C em 4% de paraformaldeído em PBS e depois armazenou-se durante um a sete dias a 4°C em 1% de paraformaldeído, PBS até serem seccionados. Cortou-se secções coronais com uma espessura

de 40 μm num vibratomo em RT e armazenou-se num crioprotector (30% de glicerol, 30% de etileno-glicol em tampão de fosfato) a -20°C antes do processamento imunohistoquímico. Incubou-se, de um dia para o outro, para cada um dos cérebros, seis secções ao nível do hipocampo dorsal, cada uma separada por intervalos consecutivos de 240 μm , com um dos seguintes anticorpos: (1) uma anti-A β biotinilado (mAb, 3D6, específico para A β humana) diluído para uma concentração de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em PBS e 1% de soro de cavalo; ou (2) um mAb biotinilado específico para APP humana, 8E5, diluído para uma concentração de 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em PBS e 1,0% de soro de cavalo; ou (3) um mAb específico para uma proteína acídica fibrilar glial (GFAP; Sigma Chemical Co.) diluído em 1:500 com 0,25% Triton X-100 e 1% de soro de cavalo, em tampão salino Tris, pH 7,4 (TBS); ou (4) um mAb específico para CD11b, antigénio MAC-1, (Chemicon International) diluído em 1:100 com 0,25% Triton X-100 e 1% de soro de coelho em TBS; ou (5) um mAb específico para um antigénio MHC II, (Pharmingen) diluído em 1:100 com 0,25% Triton X-100 e 1% de soro de coelho em TBS; ou (6) um mAb específico do rato para CD 43 (Pharmingen) diluído em 1:100 com 1% de soro de coelho em PBS ou (7) um mAb específico do rato para CD 45RA (Pharmingen) diluído em 1:100 com 1% de soro de coelho em PBS; ou (8) um A β monoclonal específico do rato para CD 45RB (Pharmingen) diluído em 1:100 com 1% de soro de coelho em PBS; ou (9) um A β monoclonal específico do rato para for CD45 (Pharmingen) diluído em 1:100 com 1% de soro de coelho em PBS; ou (10) um A β policlonal biotinilado específico do hamster para for CD3e (Pharmingen) diluído em 1:100 com 1% do soro do coelho em PBS ou (11) um mAb específico do rato para CD3 (Serotec)

diluído em 1:200 com 1% do soro do coelho em PBS; ou com (12) uma solução em PBS á qual falta um anticorpo primário que contém 1% de soro normal do cavalo.

Fez-se reagir as secções com as soluções de anticorpos listadas em in 1,2 e 6-12 acima mencionadas e tratou-se previamente com 1,0% Triton X-100, 0,4% de peróxido de hidrogénio em PBS durante 20 minutos em RT para bloquear a peroxidase endógena. Incubou-se seguidamente de um dia para o outro a 4°C com anticorpo primário. Fez-se reagir as secções com 3D6, com 8E5 ou com CD3e mAbs e depois fez-se reagir durante uma hora em RT com um complexo peroxidase-avidina-biotina de rábano com um estojo de componentes "A" e "B" diluído em 1:75 em PBS (Vector Elite Standard Kit, Vector Labs, Burlingame, CA.).

Desenvolveu-se as secções em 0,01% de peróxido de hidrogénio, 0,05% de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) em RT. Tratou-se previamente as secções destinadas à incubação com anticorpos específicos de GFAP-, MAC1-AND MHC II, com 0,6% de peróxido de hidrogénio em RT para bloquear a peroxidase endógena que tinha sido incubada de um dia para o outro com anticorpo primário a 4°C. Incubou-se as secções que reagiram com anticorpo GFAP durante 1 hora em RT com IgG anti-murganho biotinilada realizada no cavalo (Vector Laboratories; Vectastain Elite ABC Kit) diluída em 1:200 com TBS. Depois fez-se reagir as secções durante uma hora cm um complexo de peroxidase-avidina-biotina (Vector Laboratories; Vectastain Elite ABC Kit) diluída em 1:1000 com TBS. Fez-se reagir, subsequentemente, as secções incubadas com o anticorpo monoclonal específico de MAC-1 ou MHC II como anticorpo primário durante 1 hora em RT com IgG anti-murganho biotinilada realizada no coelho diluída com

1:200 com TBS, e depois incubou-se durante uma hora com um complexo de peroxidase-avidina-biotina diluído em 1:1000 com TBS. Depois visualizou-se as secções incubadas com anticorpos específicos de GFAP-, MAC-1 e MHC II por tratamento em RT com 0,05% DAB, 0,01% peróxido de hidrogénio, 0,04% cloreto de níquel, TBS durante 4 e 11 minutos, respectivamente.

Montou-se as secções imunomarcadas em lamelas de vidro (VWR, Superfrost slides), secou-se ao ar de um dia para o outro, mergulhou-se em Propar (Anatech) e espalhou-se em lamelas utilizando Permount (Fisher) como meio de montagem.

Para intercolorar as placas de A β , montou-se as secções de GFAP-positivas em lamelas Superfrost e incubou-se em meio aquoso a 1% de Tioflavina S (Sigma) durante 7 minutos e depois submeteu-se a processamento imunohistoquímico. Desidratou-se então as secções e retirou-se com Propar e espalhou-se em lamelas montadas com Permount.

8. Análise de imagens

Utilizou-se um sistema videométrico 150 de análise de imagens (Oncor, Inc., Gaithersburg, MD) ligado a um microscópio Nikon Microphot-FX através de uma câmara de vídeo CCD e um monitor Sony Trinitron para a quantificação de lamelas imunorreactivas. Armazenou-se a imagem da secção no tampão do vídeo e determinou-se o limiar com base na cor e na saturação para seleccionar e calcular a área total de pixéis ocupada pelas estruturas imunomarcadas. Salientou-se manualmente o hipocampo, para cada secção e calculou-se a área total de pixéis ocupada pelo hipocampo. Mediu-se a carga percentual amilóide como: (a fracção da área do hipocampo que contém depósitos de A β imunorreactiva

com mAb 3D6) x 100. Do mesmo modo, mediu-se a carga neurítica percentual como: (a fracção da área do hipocampo que contém neuríticos distróficos reactivos com anticorpo monoclonal 8E5)x100. Utilizou-se o C-Imaging System (Compix, Inc., Cranberry Township, PA) através da aplicação informática Simple 32, ligada a um microscópio Nikon Microphot-FX através de uma câmara Optronics para quantificar a percentagem do córtex retrosplenial ocupado por astrócitos GFAP positivos e por microgliócitos MAC-1 e MHC II positivos. Armazenou-se a imagem da secção imunorreactiva num tampão de vídeo e determinou-se o limiar com base monocromática para seleccionar e calcular a área total de pixéis ocupada pelas células imunomarcadas. Saliou-se manualmente, para cada secção, o córtex retrosplenial (RSC) e calculou-se a área total de pixéis ocupada pelo RSC. Definiu-se a percentagem da astrocitose como: (a fracção de RSC ocupada pelos astrócitos GFAP positivos)X100. Do mesmo modo, definiu-se a percentagem da microgliose como: (a fracção de RSC ocupada por microgliócitos MAC-1-ou MHC II reactivos)X100. Quantificou-se para cada animal, para todas as análises de imagens, seis secções ao nível do hipocampo dorsal, cada uma separada por intervalos consecutivos de 240 µm. Em todos os casos, o estado do tratamento dos animais era desconhecido do observador.

XIV: Ensaio de pesquisa *ex vivo* quanto à actividade de um anticorpo contra depósitos amilóides

Determinou-se um ensaio *ex vivo* no qual eram mantidas em cultura células microgliais primárias com secções criostáticas não fixadas de murganho PDAPP ou de cérebros

humanos AD, de modo a examinar os efeitos dos anticorpos na limpeza das placas. As células microgliais foram obtidas a partir de córtices cerebrais de murganhos DBA/2N neonatais (1-3 dias). Os córtices foram dissociados mecanicamente em HBSS (Hanks'Balanced Salt Solution, Sigma) com 50 µg/mL de DNase I (Sigma). Filtrou-se as células dissociadas com um filtro celular de 100 µm (Falcon) e centrifugou-se a 1000 rpm durante 5 minutos. Suspendeu-se novamente os grânulos em meio de crescimento (glicose elevada DMEM, 10% FBS, 25ng/mL rmGM-CSF) e colocaram-se as células em placas com uma densidade de 2 cérebros por frasco de cultura de plástico T-75. Decorridos 7-9 dias, fez-se rodar os frascos num agitador orbital a 200 rpm durante 2h a 37°C. Centrifugou-se a suspensão celular a 1000 rpm suspendeu-se novamente no meio de ensaio.

Montou-se então secções 10-µm criostáticas de murganhos PDAPP ou de cérebros humanos DA (intervalo *post-mortem* < 3 horas) em lamelas de vidro redondas cobertas com poli-lisina e colocou-se em cavidades de placas de cultura de tecido de 24 cavidades. As lamelas foram lavadas duas vezes com meio de ensaio constituído por H-SFM (meio livre de soro de hibridoma, Gibco BRL) com 1% FBS, glutamina, penicilina/estreptomicina e 5ng/mL de rmGM-CSF (R&D). Adicionou-se anticorpos de controlo ou anti-Aβ numa concentração de 2x (5 µg/mL final) durante 1 hora. Desenvolveu-se então células microgliais com uma densidade of $0,8 \times 10^6$ células/mL de meio de ensaio. Manteve-se as culturas num incubador humidificado (37°C, 5% CO₂) durante 24 horas ou mais. No fim da incubação fixou-se as culturas com 4% de paraformaldeído e permeabilizou-se com 0,1% de Triton-X100. Manchou-se as secções com 3D6 biotinilado

seguido de um conjugado de estreptavidina/Cy3 (Jackson ImmunoResearch). As células microgliais exógenas foram visualizadas por análise de manchas nucleares (DAPI). Observou-se as culturas com um microscópio invertido fluorescente (Nikon, TE300) e foram tiradas fotomicrografias com uma câmara digital SPOT utilizando o programa informático SPOT (Diagnostic instruments). Para se realizar a análise de transferência de Western, as culturas foram extraídas em ureia 8M, diluídas em 1:1 em tampão de amostra de tricina reduzida e mantidas em gel de tricina a 16% (Novex). Após transferência para 'Immobilon', expôs-se as manchas a 5 µg/ml de pabA1342 seguindo por um anticorpo anti-murganho conjugado com HRP e desenvolveu-se com ECL (Amersham).

Após a realização do ensaio com secções do cérebro de PDAPP na presença do anticorpo 16C11 (um dos anticorpos contra A β que não se demonstrou eficaz *in vivo*), as placas de β -amilóide mantiveram-se intactas e não se observou qualquer fagocitose. Pelo contrário, quando se fez a cultura das secções adjacentes na presença de 10D5, já os depósitos amilóides tinham desaparecido e as células microgliais demonstravam numerosas vesículas fagocíticas contendo A β . Foram obtidos resultados idênticos com as secções do cérebro DA; 10D5 induziu a fagocitose das placas de DA, enquanto 16C11 era ineficaz. Além disso, o ensaio proporcionou resultados comparáveis quando realizado com murganhos ou com células microgliais humanas e com anticorpos de murganhos, de coelhos ou de primatas contra A β .

No quadro 16 estão demonstrados os resultados obtidos com diversos anticorpos contra A β , comparando a sua aptidão

para induzir a fagocitose no ensaio *ex vivo* e para reduzir a carga de placas *in vivo* em estudos de transferência passiva. Embora o 16C11 e o 21F12 se liguem ao agregado peptídico A β sintético com elevada avidéz, estes anticorpos foram incapazes de reagir com placas β -amilóides em secções do cérebro não fixadas, não conseguiram despoletar a fagocitose no ensaio *ex vivo* e foram ineficazes *in vivo*. Activou-se o 10D5, 3D6 e o anticorpo policlonal contra A β através das três medidas. O anticorpo 22C8 liga-se mais fortemente a uma forma análoga de A β natural na qual o ácido aspártico nas posições 1 e 7 é substituído por ácido iso-aspártico. Estes resultados demonstram que a eficácia *in vivo* se deve à limpeza das placas directa mediada pelo anticorpo no SNC and que o ensaio *ex vivo* é previsível na eficácia *in vivo*.

Utilizou-se o mesmo ensaio para testar a limpeza de um anticorpo contra um fragmento de sinucleína em relação ao NAC. Demonstrou-se que a sinucleína é uma proteína associada a placas amilóides. Fez-se contactar um anticorpo de NAC com uma amostra de tecido cerebral contendo placas amilóides e células microgliais, tal como descrito antes. Utilizou-se soro de coelho como controlo. A monitorização subsequente revelou uma redução notória no número e no tamanho das placas, indicando a actividade de limpeza do anticorpo.

Quadro 16 Ensaio *ex vivo* para prever a eficácia *in vivo*

Anticorpo	Isotipo	Avidez para Aβ agregado (pM)	Ligação a placas β- amilóides	Eficácia <i>ex vivo</i>	Eficácia <i>in vivo</i>
monoclonal					
3D6	IgG2b	470	+	+	+
10D5	IgG1	43	+	+	+
16C11	IgG1	90	-	-	-
21F12	IgG2a	500	-	-	-
TM2a	IgG1	-	-	-	-
policlonal					
1-42	mistura	600	+	+	+

Utilizou-se um microscópio confocal para confirmar que a A β foi internalizada durante o decurso do ensaio *ex vivo*. Na presença de anticorpos de controlo, as células microgliais exógenas mantiveram-se num plano confocal acima do tecido, onde não existiam vesículas fagocíticas contendo A β , e as placas mantiveram-se intactas dentro da secção. Na presença de 10D5, a maior parte do material das placas estava contido nas vesículas dentro das células microgliais exógenas. Para se determinar o destino do péptido internalizado extraíram-se as culturas tratadas com 10D5 e com ureia 8M em diversos pontos temporais, e examinaram-se por análise de transferência de Western. Na primeira hora temporal, quando ainda não tinha ocorrido qualquer fagocitose, a reacção com um anticorpo policlonal contra A β revelou uma forte banda com 4 kD (correspondente ao péptido A β). A imunoreactividade de A β diminui no dia 1 e já não

existia no dia 3. Deste modo, a fagocitose de A β mediada por anticorpo leva à sua degradação.

Para determinar se a fagocitose no ensaio *ex vivo* era mediada por Fc, foram preparados fragmentos F(ab')₂ do anticorpo 3D6 do anti-A β . Apesar de os fragmentos de F(ab')₂ reterem a sua completa aptidão para reagir com placas, foram incapazes de despoletar a fagocitose através das células microgliais. Além disso, a fagocitose com o anticorpo completo poderia ser bloqueada por um reagente contra os receptores Fc de murinos (anti-CD16/32). Estes dados indicam que a limpeza *in vivo* de A β ocorre através da fagocitose mediada pelo receptor Fc.

XV: Passagem de anticorpos pela barreira de hematoencefálica

As experiências aqui descritas foram realizadas para proporcionar informação em relação à aptidão dos anticorpos para passarem para o cérebro através de injeção intravenosa e para proporcionar meios para medir a concentração do anticorpo administrado ao cérebro através de injeção intravenosa no tecido periférico de murganhos normais ou murganhos PDAPP. Tais medições são úteis para prever e para determinar dosagens eficazes.

Os murganhos PDAPP ou os murganhos normais de controlo foram revestidos com 0,9% de NaCl. As regiões do cérebro (hipocampo ou córtex) foram dissecadas e congeladas rapidamente. Os cérebros foram homogeneizados com 0,1% de triton + inibidores de protease. A imunoglobulina foi detectada nos extractos através do método ELISA. Revestiu-se a IgG anti-murganho de cabra Fab'₂ numa placa RIA como

reagente de captura. Incubou-se o soro ou os extractos do cérebro durante 1 hora. Os isotipos foram detectados com IgG1-HRP anti-murganho, com IgG2a-HRP ou com IgG2b-HRP (Caltag). Os anticorpos, independentemente do isotipo, estiveram presentes no SNC numa concentração igual a 1:1000 à encontrada no sangue. Por exemplo, quando a concentração de IgG1 era três vezes superior à IgG2a no sangue, a IgG2a era também três vezes superior no cérebro, estando ambas presentes no sangue em 0,1% dos seus níveis respectivos. Este resultado foi observado em murganhos transgénicos e não transgénicos - deste modo, os murganhos PDAPP possuem uma barreira hematoencefálica que não permite uma única passagem.

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

A presente listagem de referências citadas pelo requerente é apresentada meramente por razões de conveniência para o leitor. Não faz parte da patente de invenção europeia. Embora se tenha tomado todo o cuidado durante a compilação das referências, não é possível excluir a existência de erros ou omissões, pelos quais o IEP não assume nenhuma responsabilidade.

Patentes de invenção citadas na descrição

- US SN09201430 A [0007]
- US SN09322289 A [0007]
- US 4666829 A [0072]
- WO 9512608 A [0096]
- WO 9306121 A [0096]
- WO 9408051 A [0096]
- WO 9535503 A [0096]
- WO 9530642 A [0096]
- WO 9118980 A, Devlin [0096]
- US 5612486 A, McConlogue [0097]
- WO 9007861 A [0113]
- US 5693762 A [0113]
- US 5693761 A [0113]
- US 5585089 A [0113]
- US 5530101 A [0113]
- US 5225539 A, Winter [0113]
- WO 9222653 A, Carter [0113]
- US 4634664 A, Oestberg [0117]
- US 4634666 A, Engleman [0117]
- WO 9312227 A, Lonberg [0121]
- US 5877397 A [0121]

- US 5874299 A [0121]
- US 5814318 A [0121]
- US 5789650 A [0121]
- US 5770429 A [0121]
- US 5661016 A [0121]
- US 5633425 A [0121]
- US 5625126 A [0121]
- US 5569825 A [0121]
- US 5545806 A [0121]
- WO 9110741 A, Kucherlapati [0121]
- WO 9117271 A, Dower [0122]
- WO 9201047 A, McCafferty [0122]
- US 5877218 A [0122]
- US 5871907 A [0122]
- US 5858657 A [0122]
- US 5837242 A [0122]
- US 5733743 A [0122]
- US 5565332 A [0122]
- WO 9220791 A, Winter [0123]
- US 5741957 A [0129]
- US 5304489 A [0129]
- US 5849992 A [0129]
- US 5314813 A, Peterson [0132]
- WO 9717613 A, O'Mahony [0134]
- WO 9717614 A [0134]
- US 5196512 A [0139]
- EP 378881 A [0139]
- EP 427347 A [0139]
- US 5736142 A [0139] [0140]
- US 5229490 A [0139]
- US 5643576 A [0145]

- WO 9634625 A [0145]
- WO 9412629 A, Woo [0145]
- US 5208036 A [0146]
- US 5264618 A [0146]
- US 5279833 A [0146]
- US 5283185 A [0146]
- US 5399346 A [0147]
- US 5593970 A [0147]
- WO 9505853 A [0147]
- GB 2220211 A [0160]
- US 5057540 A [0160]
- WO 9840100 A [0160]
- WO 9014837 A [0161]

Literatura citada na descrição, para além das patentes de invenção

- **Tan, S.Y.; Pepys.** *Histopathology*, 1994, vol. 25, 403-414 [0005]
- **Harrison's Handbook of Internal Medicine.** McGraw-Hill, 1995 [0005]
- **Sambrook et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Press, 1989 [0018]
- **Ausubel, F.M. et al.** *Current Protocols in Molecular Biology.* John Wiley & Sons, 1998 [0018]
- **Remington's Pharmaceutical Sciences.** 1995 [0030]
- **Gustavsson, A. et al.** *Laboratory Invest.*, 1995, vol. 73, 703-708 [0052]
- **Kametani, F. et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, vol. 125, 622-628 [0052]
- **Pras, M. et al.** *PNAS*, 1983, vol. 80, 539-42 [0052]

- **Benson, M.D. et al.** *CIBA Fdn. Symp.*, 1996, vol. 199, 104-131 [0054]
- **Glenner ; Wong.** *Biochem Biophys. Res. Comm.*, 1984, vol. 129, 885-890 [0055]
- **Glenner ; Wong.** *Biochem Biophys. Res. Comm.*, 1984, vol. 122, 1131-1135 [0055]
- **Kangas, H. et al.** *Human Mol. Genet.*, 1996, vol. 5 (9), 1237-1243 [0057]
- **Isselbacher et al.** *Harrison's Principles of Internal Medicine.* McGraw-Hill, 1995 [0058]
- **Nagai, A. et al.** *Molec. Chem. Neuropathol.*, 1998, vol. 33, 63-78 [0058]
- **Baldwin et al.** *Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders.* John Wiley and Sons, 1995 [0059]
- **Beekes, M. et al.** *J. Gen. Virol.*, 1995, vol. 76, 2567-76 [0059]
- **Glenner ; Wong.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, vol. 120, 1131 [0072]
- **Hardy.** *TINS*, 1997, vol. 20, 154 [0072]
- **Games et al.** *Nature*, 1995, vol. 373, 523-7 [0073]
- **Hardy et al.** *TINS*, 1997, vol. 20, 55-158 [0079]
- **Liepnieks, J.J. et al.** *Biochem. Biophys Acta*, 1995, vol. 1270, 81-86 [0082]
- **Westermarck et al.** *Am. J. Path.*, 1995, vol. 147, 1186-92 [0090]
- **Sambrook et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* C.S.H.P. Press, 1989 [0093]
- *Essential Immunology.* Blackwell Scientific Publications, 181 [0095]
- **Hsiao et al.** *Science*, 1996, vol. 274, 99 [0097]

- **Staufenbiel et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, 13287-13292 [0097]
- **Sturchler-Pierrat et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, 13287-13292 [0097]
- **Borchelt et al.** *Neuron*, 1997, vol. 19, 939-945 [0097]
- **Clayton, D.F. et al.** *TINS*, 1998, vol. 21 (6), 249-255 [0100]
- **George, J.M. et al.** *Neurosci. News*, 1995, vol. 1, 12-17 [0100]
- *Fundamental Immunology*. Raven Press, 1989 [0109]
- **Kabat.** *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. National Institutes of Health, 1987 [0110]
- **Chothia; Lesk.** *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901-917 [0110]
- **Chothia et al.** *Nature*, 1989, vol. 342, 878-883 [0110]
- **Harlow; Lane.** *Antibodies, A Laboratory Manual*. CSHP, 1988 [0111]
- **Queen et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 10029-10033 [0113]
- **Oestberg et al.** *Hybridoma*, 1983, vol. 2, 361-367 [0117]
- *Nature*, 1994, vol. 148, 1547-1553 [0121]
- *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 826 [0121]
- **Huse et al.** *Science*, 1989, vol. 246, 1275-1281 [0122]
- **Winnacker.** *From Genes to Clones*. VCH Publishers, 1987 [0128]
- **Queen et al.** *Immunol. Rev.*, 1986, vol. 89, 49 [0128]
- **Co et al.** *J. Immunol.*, 1992, vol. 148, 1149 [0128]
- **Scopes.** *Protein Purification*. Springer-Verlag, 1982 [0131]
- *Immun. Rev.*, 1982, vol. 62, 185 [0135]

- **Lawrie; Tumin.** *Cur. Opin. Genet. Develop.*, 1993, vol. 3, 102-109 [0145]
- **Bett et al.** *J. Virol.*, 1993, vol. 67, 5911 [0145]
- **Zhou et al.** *J. Exp. Med.*, 1994, vol. 179, 1867 [0145]
- **Dubensky et al.** *J. Virol.*, 1996, vol. 70, 508-519 [0145]
- **Ohe et al.** *Human Gene Therapy*, 1995, vol. 6, 325-333 [0145]
- **Xiao; Brandsma.** *Nucleic Acids. Res.*, 1996, vol. 24, 2630-2622 [0145]
- **McGee et al.** *J. Micro Encap.*, 1996 [0146]
- **Kensil et al.** *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach.* Plenum Press, 1995 [0160]
- **Stoute et al.** *N. Engl. J Med.*, 1997, vol. 336, 86-91 [0160]
- **Chang et al.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1998, vol. 32, 173-186 [0162]
- **Remington's Pharmaceutical Science.** 1995 [0163]
- **Langer.** *Science*, 1990, vol. 249, 1527 [0166]
- **Hanes.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1997, vol. 28, 97-119 [0166]
- **Glenn et al.** *Nature*, 1998, vol. 391, 851 [0169]
- **Paul et al.** *Eur. J. Immunol.*, 1995, vol. 25, 3521-24 [0170]
- **Cevc et al.** *Biochem. Biophys. Acta*, 1998, vol. 1368, 201-15 [0170]
- **Games et al.** *Nature* [0180]
- **Johnson-Wood et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, 1550-1555 [0203]
- **Oltersdorf et al.** *J. Biol. Chem.*, 1990, vol. 265, 4492-4497 [0232]

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica que compreende um componente amilóide eficaz para induzir uma resposta imune num paciente, um excipiente farmacêutico e um adjuvante que desencadeia ou aumenta a resposta imune ao componente amilóide, para ser utilizado no tratamento de um distúrbio **caracterizada por** deposição amilóide, em que o componente amilóide é seleccionado a partir do grupo constituído por AH, cadeia AL λ , AApoA1, ATTR, Alys, Agel, AB₂M AANF, AIAPP, Acal e sinucleína-NAC.
2. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, em que o componente amilóide é um componente fibrilar.
3. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, em que a referida composição compreende pelo menos dois componentes amilóides diferentes.
4. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, em que o referido componente amilóide é um péptido ligado a uma proteína transportadora.
5. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, em que o referido adjuvante é seleccionado a partir do grupo constituído por QS21, monofosforil-lípido, alúmen e adjuvante de Freund.
6. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que a referida resposta imune é **caracterizada por** um título

sérico de pelo menos 1:1000 em relação ao referido componente amilóide.

7. Composição de acordo com a reivindicação 6, em que o referido título sérico é pelo menos 1:5000 em relação ao referido componente.

8. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que a referida resposta imune é **caracterizada por** uma quantidade de imunorreactividade sérica correspondente a uma quantidade 4 vezes superior em relação ao nível de imunorreactividade sérica medida, numa amostra de controlo de soro antes do tratamento.

9. Composição de acordo com a reivindicação 8, em que a referida quantidade de imunorreactividade é medida numa diluição de soro de cerca de 1:100.

10. Método para determinar o prognóstico de um doente que esteja a receber tratamento para um distúrbio amilóide, que compreende a medição de uma quantidade de imunorreactividade do soro do paciente contra um componente amilóide seleccionado numa amostra de soro de um paciente, em que uma quantidade de imunorreactividade do soro do paciente de pelo menos quatro vezes o nível de controlo inicial de base de imunorreactividade sérica do paciente, antes do tratamento indica um prognóstico de um estado de melhoria em relação ao referido distúrbio, em que o componente amilóide é seleccionado de entre o grupo constituído por AH, cadeia AL λ , AApoA1, ATTR, Alys, Agel, AB₂M AANF, AIAPP, Acal e sinucleína-NAC.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, em que a referida quantidade de imunorreactividade do soro do paciente contra o referido componente amilóide é **caracterizada por** um título sérico de pelo menos cerca de 1:1000 e de preferência pelo menos cerca de 1:5000.

12. Anticorpo que se liga especificamente a um componente amilóide presente num depósito amilóide para ser utilizado na prevenção ou no tratamento de uma doença **caracterizada pelo** referido depósito amilóide, em que o referido componente amilóide é seleccionado entre o grupo constituído por AH, cadeia AL λ , AApoA1, ATTR, Alys, Agel, AB₂M AANF, AIAPP, Acal e sinucleína-NAC.

13. Anticorpo de acordo com a reivindicação 12, em que o referido componente amilóide é um componente fibrilar.

14. Anticorpo de acordo com a reivindicação 13, em que o referido anticorpo se liga a um epítopo do referido componente fibrilar.

15. Anticorpo de acordo com a reivindicação 14, em que o anticorpo se liga especificamente ao referido componente fibrilar sem se ligar a um precursor do referido componente fibrilar.

16. Anticorpo de acordo com a reivindicação 15, em que o referido anticorpo é um anticorpo humano contra o referido componente fibrilar preparado a partir de células B de um ser humano imunizado com um epítopo do componente fibrilar.

17. Anticorpo de acordo com a reivindicação 13, em que o anticorpo é um anticorpo humano.

18. Anticorpo de acordo com a reivindicação 13, em que o anticorpo é um anticorpo humanizado.

19. Anticorpo de acordo com a reivindicação 13, em que o anticorpo é um anticorpo quimérico.

20. Anticorpo de acordo com a reivindicação 13, em que o anticorpo é um isotipo IgG1 humano.

21. Composição farmacêutica para ser utilizada na prevenção ou tratamento de uma doença **caracterizada por** uma deposição amilóide, em que a referida composição compreende um anticorpo que se liga especificamente a um componente amilóide presente num depósito amilóide em combinação com um segundo anticorpo que se liga a um segundo componente amilóide presente num depósito amilóide, em que os componentes amilóides são seleccionados de entre o grupo constituído por AH, cadeia AL λ , AApoA1, ATTR, Alys, Agel, AB₂M AANF, AIAPP, Acal e sinucleína-NAC.

22. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 12-20 ou com a composição da reivindicação 21 que é adaptado para administração intraperitoneal, oral, subcutânea, intramuscular, intranasal, tópica ou intravenosa.

23. Anticorpo ou composição de acordo com as reivindicações 12-22, adaptado para ser administrado em dosagens múltiplas durante um período pelo menos de seis meses.

24. Anticorpo ou composição de acordo com as reivindicações 12-22, adaptado para ser administrado como uma composição de libertação prolongada.

TÍTULO DE A β_{42} AGREGADA, INJECTADA EM MURGANHOS PDAPP AO LONGO DO TEMPO

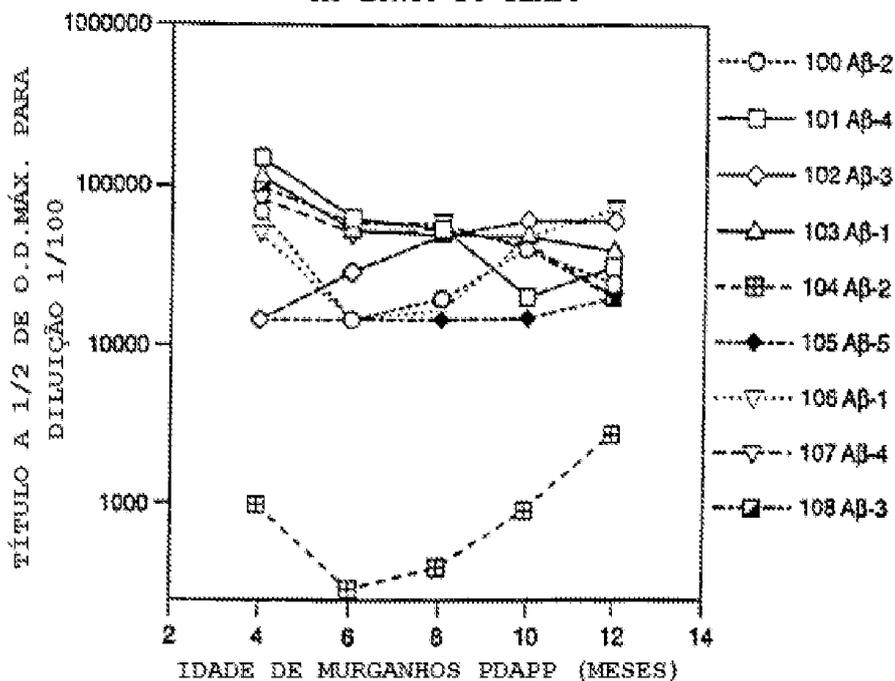


FIG. 1

ESTUDO 001
CARGA AMILÓIDE NO HIPOCAMPO

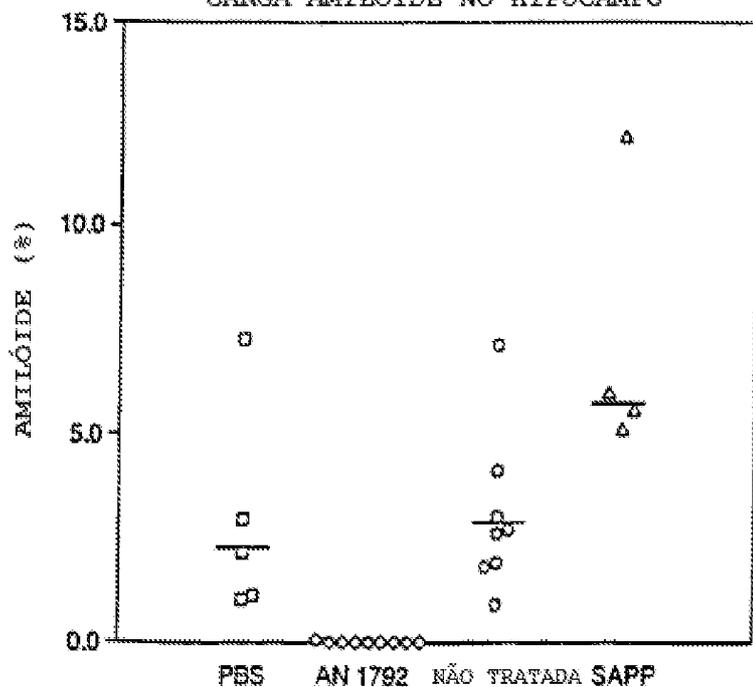


FIG. 2

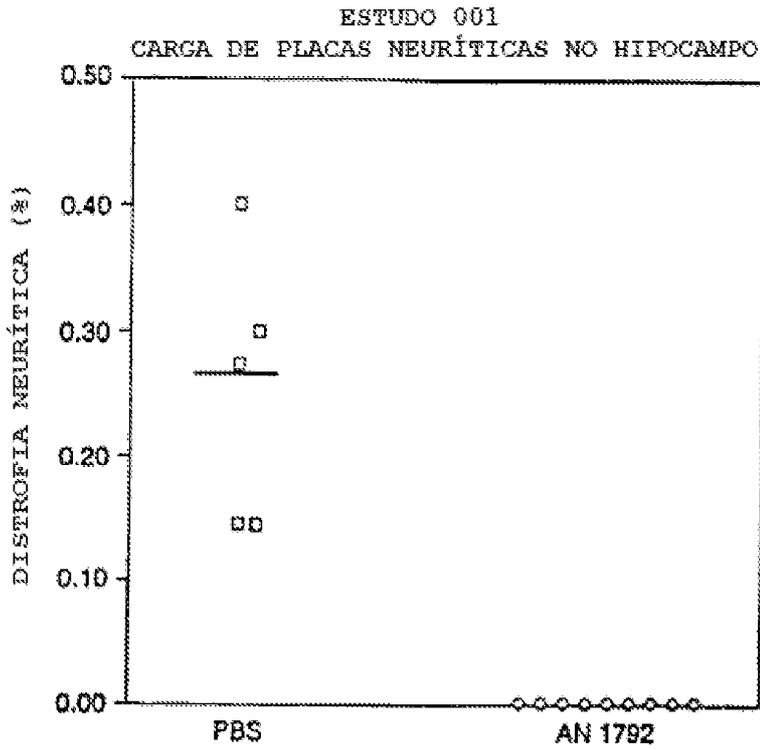


FIG._3

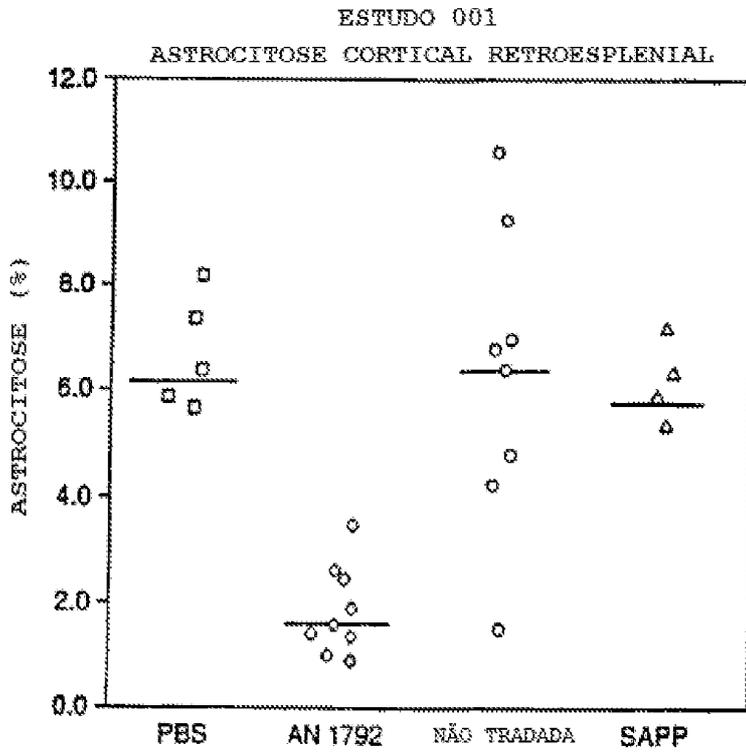


FIG._4

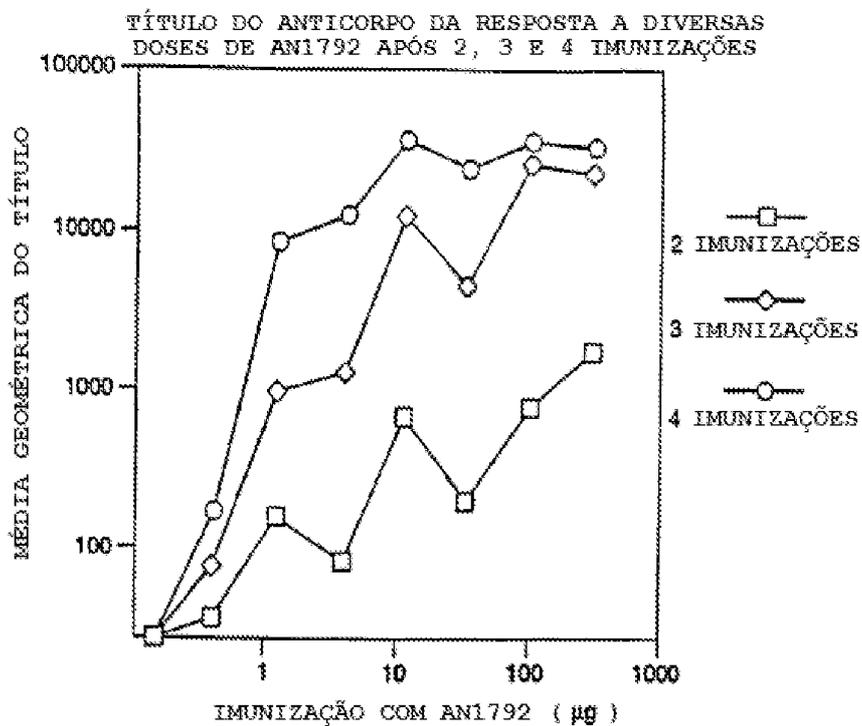


FIG. 5

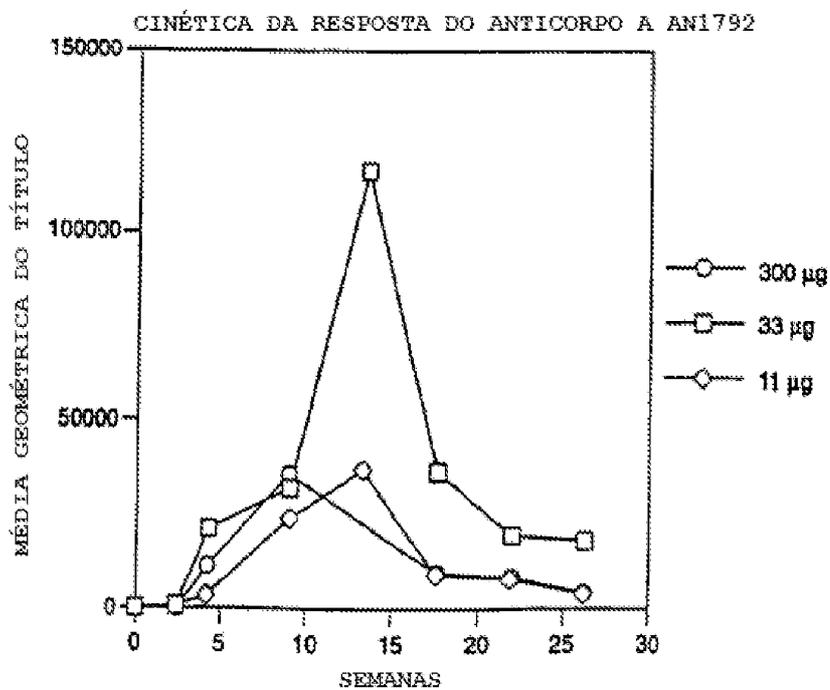


FIG. 6

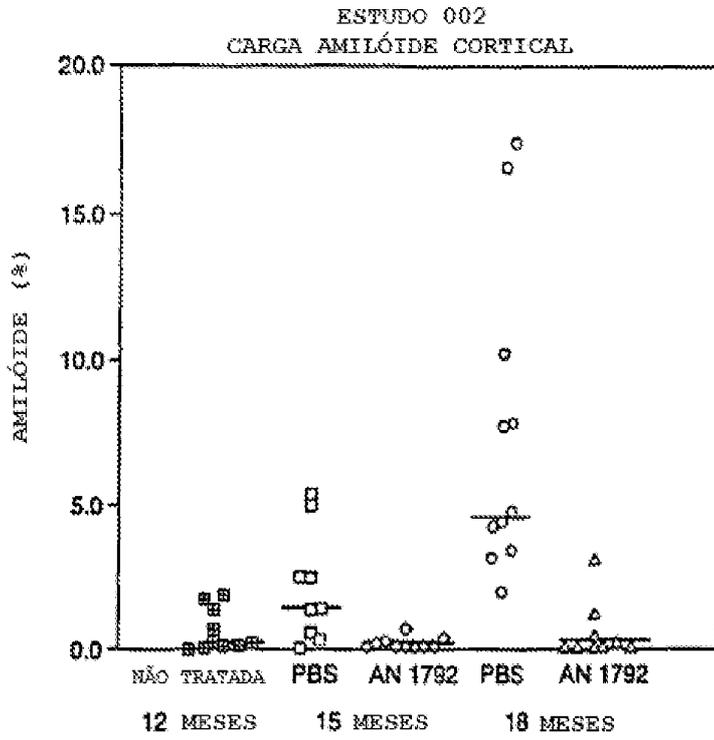


FIG. 7

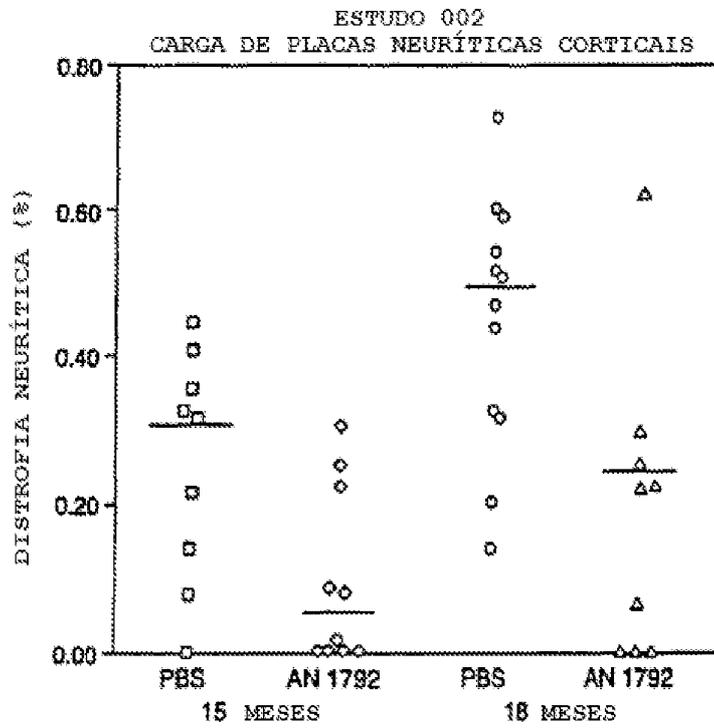


FIG. 8

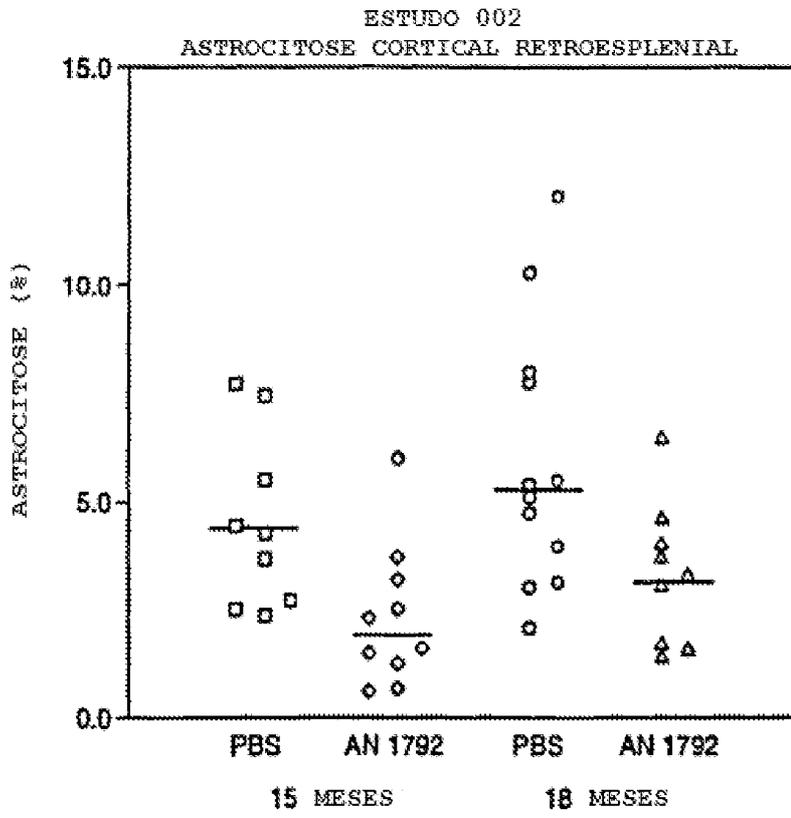


FIG. 9

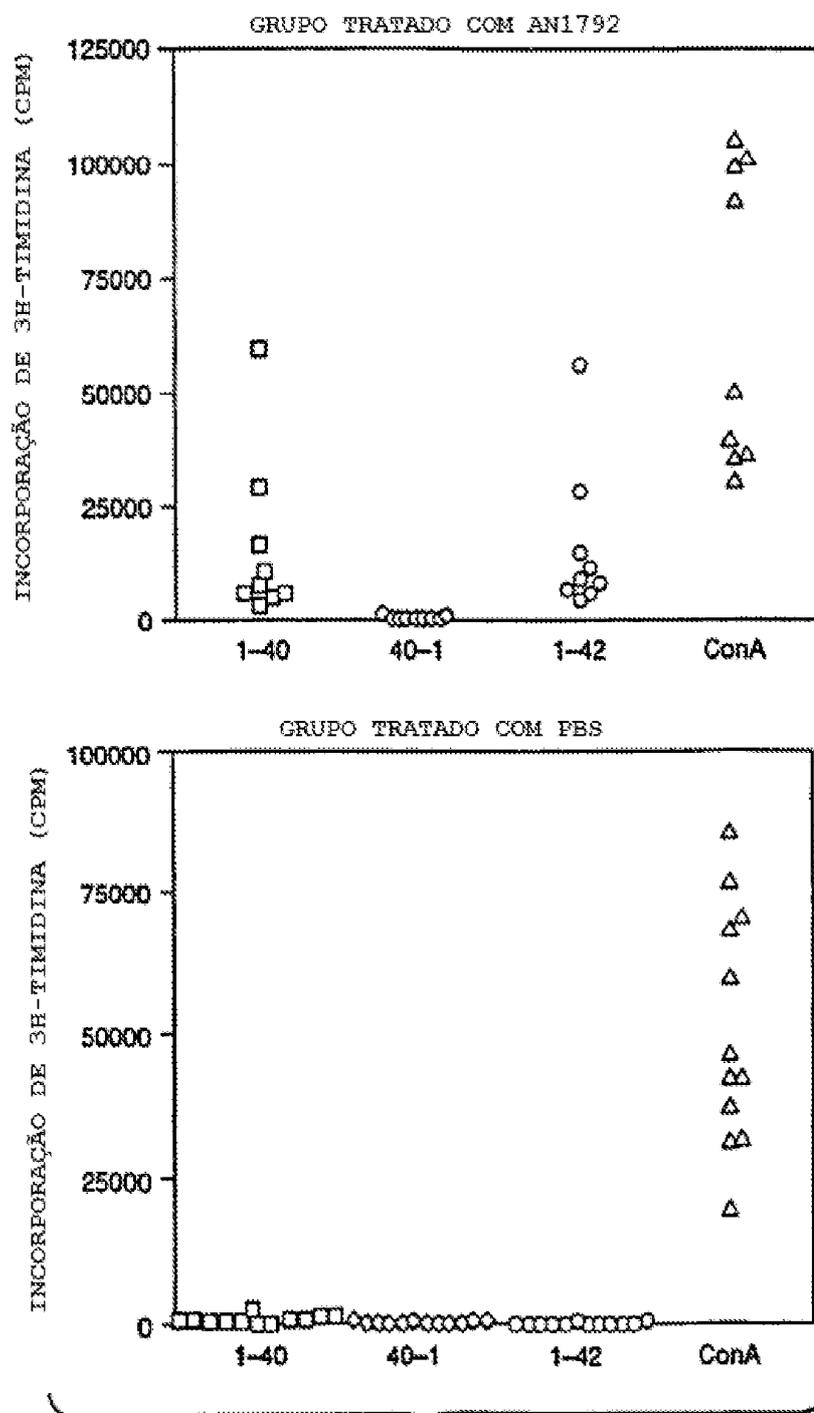
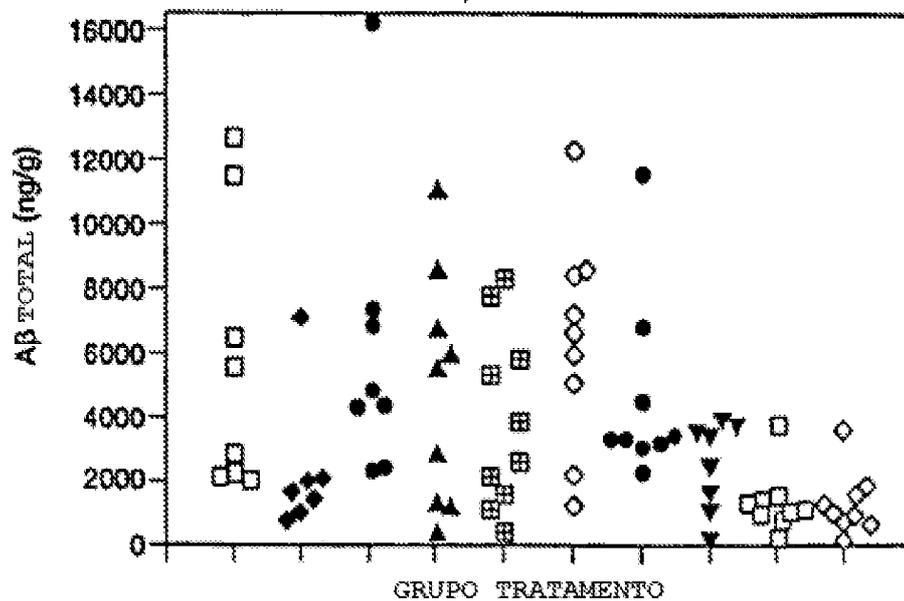
ESTUDO 002
ASTROCITOSE CORTICAL RETROESPLENIAL

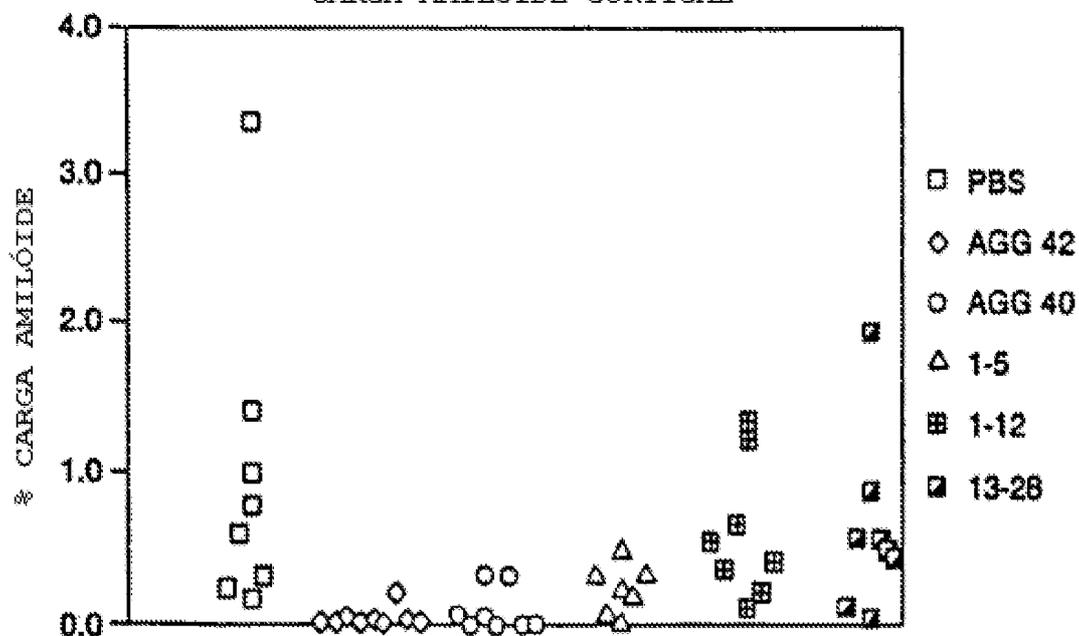
FIG. 10

ESTUDO 006

EFICÁCIA TERAPÊUTICA DE FRAGMENTOS
DADOS DE A β TOTAL CORTICAL**FIG. 11**

ESTUDO 006

CARGA AMILÓIDE CORTICAL

**FIG. 12**

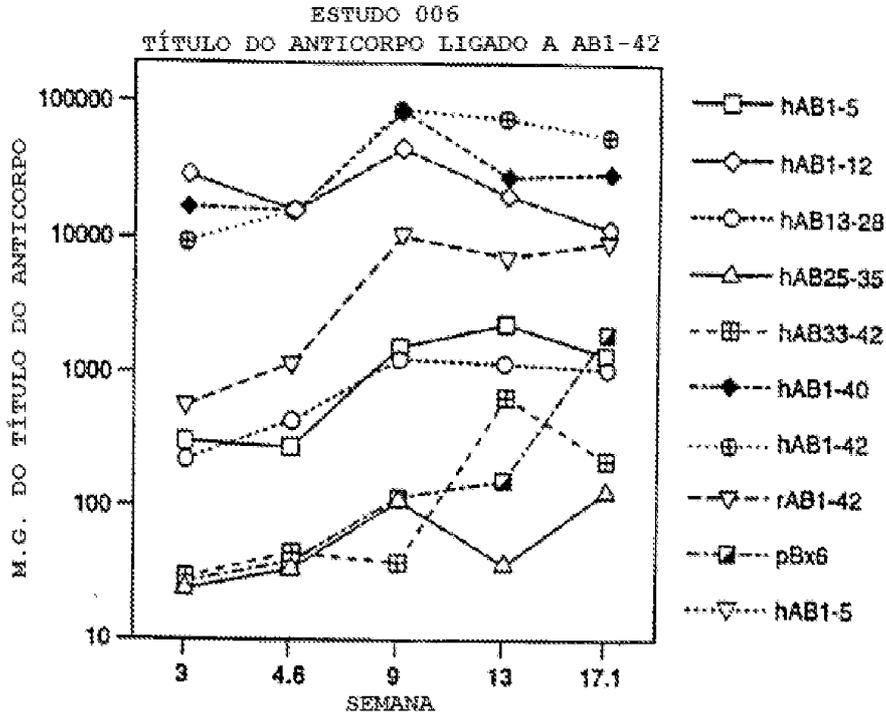


FIG. 13

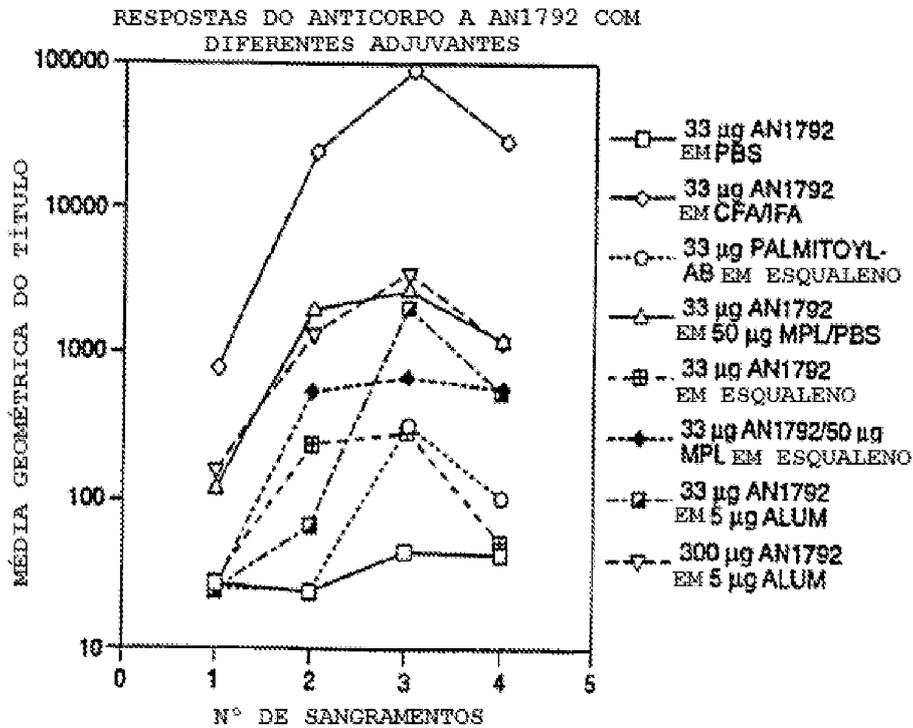


FIG. 14

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	897-193	453
732-178	179	898-194	2996
733-179	1329	899-195	1075
734-180	5665		
VALOR p MEDIANO (M-W)	1817	VALOR p MEDIANO (M-W)	1153
MÉDIA DES. PAD. % CV VALOR p (TESTE t)	1931 1718 89 n=16	MÉDIA DES. PAD. % CV VALOR p (TESTE t)	1825 1769 97 n=15

FIG. 15A

CÓRTEX

2 mg ALUM 100 µg AN1528		50 µg MPL 100 µg AN1528	
660-083	295	643-105	385
661-084	3180	644-106	2540
662-085	2480	645-107	2403
663-086	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
VALOR p	2051	VALOR p	1741
MEDIANO (M-W)		MEDIANO (M-W)	
MÉDIA	2407	MÉDIA	2140
DES. PAD.	1913	DES. PAD.	1659
% CV	79	% CV	78
VALOR p (TESTE t)	n=20	VALOR p (TESTE t)	n=21

FIG. 15B

CÓRTEX

25 µg QS21 100 µg AN1528		CEA/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		
VALOR p MEDIANO (M-W)	1199	VALOR p MEDIANO (M-W)	475 0.0481
MÉDIA DES. PAD. % CV VALOR p (TESTE t) n=21	1552 1364 88	MÉDIA DES. PAD. % CV VALOR p (TESTE t) n=15	637 655 103 0.0106

FIG. 15C

CÓRTEX

5 µg TIMEROSAL/PBS 10 µg AN1792		2 µg 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	1587	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
VALOR p	1687	VALOR p	1375
MEDIANO (M-W)		MEDIANO (M-W)	0.5000
MÉDIA	2718	MÉDIA	1394
DES. PAD.	2685	DES. PAD.	1166
% CV	99	% CV	84
VALOR p (TESTE t)	n=15	VALOR p (TESTE t)	0.2650
			n=21

FIG. 15D

CÓRTEX

50 µg MPL 100 µg AN1792		25 µg 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	1968	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		
VALOR p MEDIANO (M-W)	774 0.1710	VALOR p MEDIANO (M-W)	950 0.4076
MÉDIA DES. PAD. % CV VALOR p (TESTE t) n=21	1192 1299 109 0.1506 n=21	MÉDIA DES. PAD. % CV VALOR p (TESTE t) n=18	2199 4187 190 0.8131 n=18

FIG. 15E

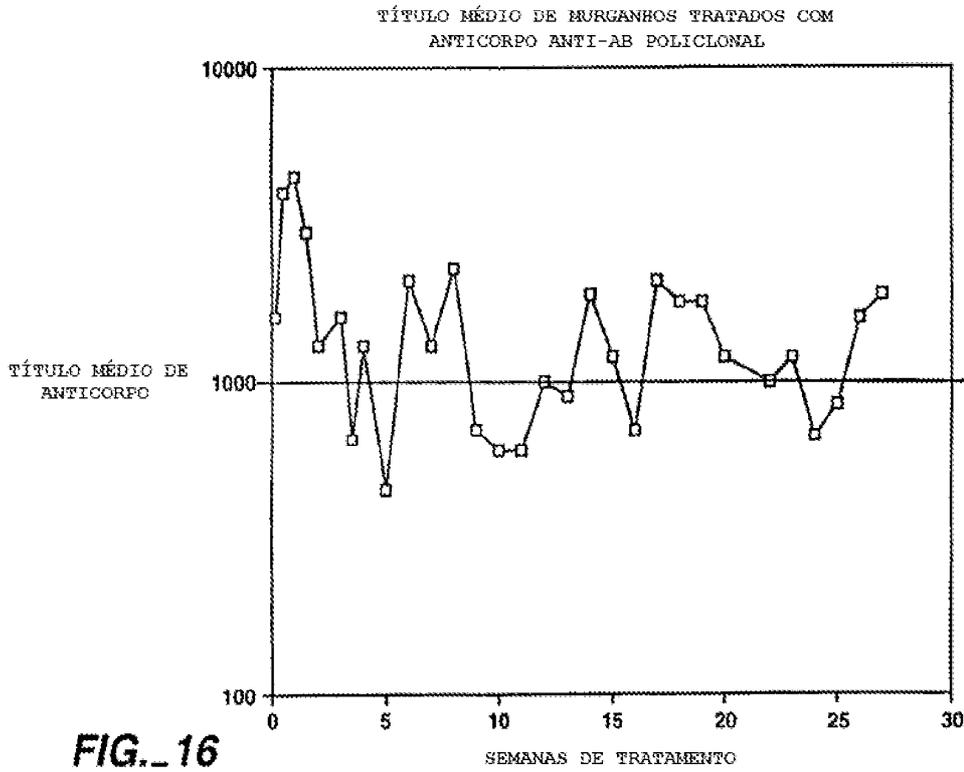


FIG. 16

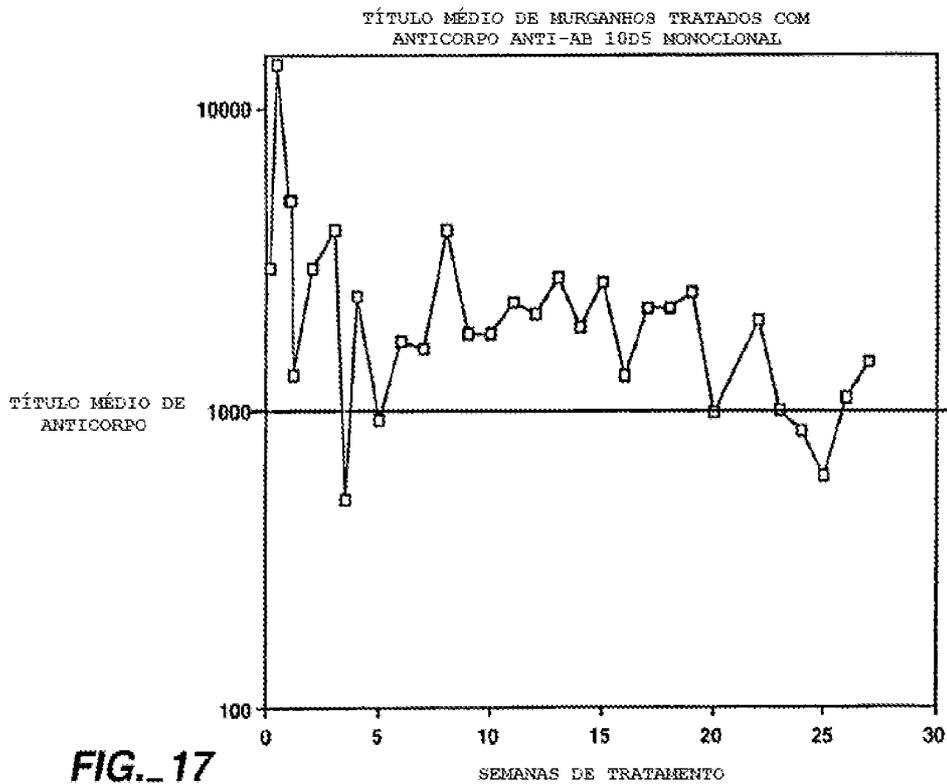
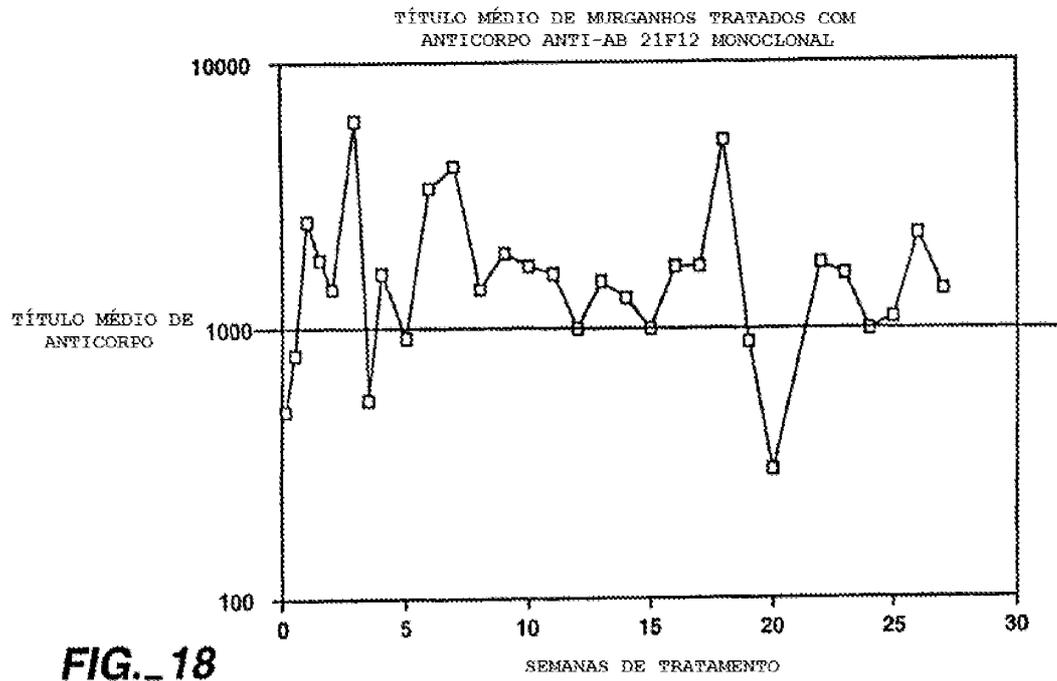


FIG. 17

**FIG._18**