



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0307837-0 B1



(22) Data do Depósito: 20/02/2003

(45) Data de Concessão: 10/11/2020

(54) Título: MOLÉCULA DE ANTICORPO ANTI-PEPTÍDEO BETA-A-4, COMPOSIÇÕES E SEUS USOS

(51) Int.Cl.: C07K 14/47; C07K 16/18; A61K 39/395; G01N 33/68.

(30) Prioridade Unionista: 20/02/2002 EP 02 003844.4.

(73) Titular(es): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG; MORPHOSYS AG.

(72) Inventor(es): MICHAEL BARDROFF; BERND BOHRMANN; MANFRED BROCKHAUS; WALTER HUBER; TITUS KRETZSCHMAR; CORINNA LÖHNING; HANSRUEDI LOETSCHER; CHRISTER NORDSTEDT; CHRISTINE ROTHE.

(86) Pedido PCT: PCT EP2003001759 de 20/02/2003

(87) Publicação PCT: WO 2003/070760 de 28/08/2003

(85) Data do Início da Fase Nacional: 20/08/2004

(57) Resumo: MOLÉCULA DE ANTICORPO, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO PARA PREPARAÇÃO DA DITA MOLÉCULA, MÉTODO COMPOSIÇÃO, USO DA REFERIDA MOLÉCULA, KIT, MÉTODO PARA OTIMIZAÇÃO DA REFERIDA MOLÉCULA, BEM COMO MÉTODO PARA PREPARAÇÃO DA DITA COMPOSIÇÃO. A presente invenção refere-se a moléculas de anticorpo capazes de especificamente reconhecer duas regiões do peptídeo β -A4, em que a dita primeira região compreende a sequência de aminoácido AEFRHDSGY conforme mostrado na SEQ ID NO:1 ou um seu fragmento e em que a segunda região compreende a sequência de aminoácido VHHOKLVFFAEDVG conforme mostrado na SEQ ID NO:2 ou um seu fragmento. Ainda, as moléculas de ácido nucléico codificando as moléculas de anticorpo da invenção e vetores e hospedeiros compreendendo as ditas moléculas de ácido nucléico são descritos. Em adição, a presente invenção provê composições, de preferência composições farmacêuticas ou de diagnóstico, compreendendo os compostos da invenção, bem como usos específicos das moléculas de anticorpo, moléculas de ácido nucléico, vetores ou hospedeiros da invenção.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"MOLÉCULA DE ANTICORPO ANTI-PEPTÍDEO BETA-A4,
COMPOSIÇÕES E SEUS USOS".**

[001] A presente invenção refere-se a moléculas de anticorpo capazes de especificamente reconhecer duas regiões do peptídeo β -A4, onde a primeira região compreende a sequência de aminoácido AEFRHDSGY conforme mostrado na SEQ ID NO:1 ou um seu fragmento e onde a segunda região compreende a sequência de aminoácido VHHQKLVFFAEDVG conforme mostrado na SEQ ID NO:2 ou um seu fragmento. Ainda, moléculas de ácido nucléico codificando as moléculas de anticorpo da invenção e vetores e hospedeiros compreendendo as ditas moléculas de ácido nucléico são descritos. Em adição, a presente invenção provê composições, de preferência composições farmacêuticas ou de diagnóstico, compreendendo os compostos da invenção, bem como usos específicos de moléculas de anticorpo, moléculas de ácido nucléico, vetores ou hospedeiros da invenção.

[002] Vários documentos são citados no texto do relatório descritivo. Cada um dos documentos citados aqui (incluindo quaisquer relatórios descritivos do fabricante, instruções, etc) são aqui incorporados a título de referência.

[003] Cerca de 70% de todos os casos de demência são devido à doença de Alzheimer que está associada a dano seletivo de regiões cerebrais e circuitos neurais críticos para cognição. A doença de Alzheimer é caracterizada por emaranhados neurofibrilares em particular em neurônios piramidais do hipocampo e várias placas amiloide contendo a maior parte um núcleo denso de depósitos de amiloide e halos neutralizados.

[004] As placas neuríticas extracelulares contêm grandes quantidades de um peptídeo predominantemente fibrilar chamado

"amiloide β ", " $A\beta_4$ ", " β -A4" ou " $A\beta$ ", vide Selkoe (1994), *Ann. Rev. Cell Biol.*, 10, 373-403, Koo (1999), *PNAS* Vol. 96, pp. 9989-9990, U.S. 4.666.829 ou Glenner (1984), *BBRC* 12, 1131. Este β amiloide é derivado da "proteína precursora de Alzheimer/proteína precursora de β -amiloide" (APP). APPs são glicoproteínas de membrana integral (vide Sisodia (1992), *PNAS* Vol. 89, pp. 6075) e são endoproteoliticamente clivadas dentro da sequência $A\beta$ por uma protease de membrana do plasma, α -secretase (vide Sisodia (1992), loc. cit.). Ainda, atividade de secretase adicional, em particular atividade β -secretase e γ -secretase, leva à liberação extracelular de amiloide β ($A\beta$) compreendendo ou 39 aminoácidos ($A\beta_{39}$), 40 aminoácidos ($A\beta_{40}$), 42 aminoácidos ($A\beta_{42}$) ou 43 aminoácidos ($A\beta_{43}$); Vide Sinha (1999), *PNAS* 96, 11094-1053; Price (1998), *Science* 282, 1078 a 1083; WO 00/72880 ou Hardy (1997), *TINS* 20, 154.

[005] Deve ser observado que $A\beta$ tem várias formas de ocorrência natural, com o que as formas humanas são referidas como $A\beta_{39}$, $A\beta_{40}$, $A\beta_{41}$, $A\beta_{42}$ e $A\beta_{43}$ acima mencionadas. A forma mais proeminente, $A\beta_{42}$, tem a sequência de aminoácido (começando do terminal N): DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO:27). Em $A\beta_{41}$, $A\beta_{40}$, $A\beta_{39}$, os aminoácidos C-terminais A, IA e VIA estão faltando, respectivamente. Na forma $A\beta_{43}$ um resíduo treonina adicional é compreendido no C-terminal da sequência acima mostrada (SEQ ID NO:27).

[006] O tempo requerido para nuclear as fibrilas de $A\beta_{40}$ foi mostrado ser significativamente mais longo do que aquele para nuclear as fibrilas de $A\beta_{42}$; Vide Koo, loc. cit. e Harper (1997), *Ann. Rev. Biochem.* 66, 385-407. Conforme revisto em Wagner (1999), *J. Clin. Invest.* 104, 1239-1332, a $A\beta_{42}$ é mais frequentemente encontrada associada com as placas neuríticas e é considerada ser mais fibrilogênica *in vitro*. Foi também sugerido que a $A\beta_{42}$ serve como uma

"semente" na polimerização dependente de nucleação de peptídeos A β não-cristalinos ordenados; Jarrett (1993), *Cell* 93, 1055-1058.

[007] Deve ser enfatizado que processamento de APP modificada e/ou a geração de placas extracelulares contendo deposições proteínáceas não são apenas conhecidos da patologia de Alzheimer, mas também de indivíduos que sofrem de outros distúrbios neurológicos e/ou neurodegenerativos. Esses distúrbios compreendem, *inter alia*, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose do tipo Holandesa, doença de Parkinson, ALS (esclerose lateral amiotrófica), doença Creutzfeldt Jacob, demência relacionada ao HIV e neuropatia motora.

[008] A fim de prevenir, tratar e/ou aliviar distúrbios e/ou doenças relacionadas à deposição patológica de placas amiloide, meios e métodos devem ser desenvolvidos, os quais ou interferem com a formação de placa β -amiloide, que são capazes de prevenir a agregação de A β e/ou são úteis na despolimerização de depósitos de amiloide já formados ou agregados de amiloide- β .

[009] Desse modo, e considerando os defeitos severos de biologia amiloide modificada e/ou patológica, meios e métodos para tratamento de distúrbios relacionados à amiloide são altamente desejáveis. Em particular, drogas eficientes que ou interferem com agregação de amiloide patológica ou que são capazes de despolimerização de A β agregado são desejadas. Ainda, meios de diagnóstico são desejáveis para detectar, *inter alia*, placas amiloide.

[0010] Desse modo, o problema técnico da presente invenção é agir de acordo com as necessidades descritas acima.

[0011] Desse modo, a presente invenção refere-se a uma molécula de anticorpo capaz de especificamente reconhecer duas regiões do peptídeo β -A4/A β 4, onde a primeira região compreende a sequência de aminoácido AEFRHDSGY (SEQ ID NO:1) ou um seu

fragmento e onde a segunda região compreende a sequência de aminoácido VHHQKLVFFAEDVG (SEQ ID NO:2) ou um seu fragmento.

[0012] No contexto da presente invenção, o termo "molécula de anticorpo" refere-se a moléculas de imunoglobulina completas, de preferência IgMs, IgDs, IgEs, IgAs ou IgGs, com mais preferência IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 ou IgG4 bem como partes de tais moléculas de imunoglobulina, tais como fragmentos Fab ou regiões V_L , V_H ou CDR. Ainda, o termo refere-se a moléculas de anticorpo modificadas e/ou alteradas, tais como anticorpos quiméricos e humanizados. O termo também refere-se a anticorpos monoclonais ou policlonais modificados ou alterados bem como anticorpos recombinantemente ou sinteticamente gerados/sintetizados. O termo também refere-se a anticorpos intactos bem como a fragmentos de anticorpo/suas partes, tal como, cadeias leves e pesadas separadas, Fab, Fab/c, Fv, Fab', F(ab')₂. O termo "molécula de anticorpo" também compreende derivados de anticorpo, os anticorpos bifuncionais e construções de anticorpo, tal como Fvs de cadeia simples (scFv), scFvs biespecíficos ou proteínas de fusão de anticorpo. Detalhes adicionais sobre o termo "molécula de anticorpo" da invenção são providos abaixo.

[0013] O termo "especificamente reconhecendo" significa de acordo com a presente invenção que a molécula de anticorpo é capaz de especificamente interagir com e/ou se ligar a pelo menos dois aminoácidos de cada uma das duas regiões de β -A4 conforme aqui definido. O dito termo refere-se à especificidade da molécula de anticorpo, isto é, à sua habilidade em discriminar entre as regiões específicas do peptídeo β -A4 conforme aqui definido e uma outra, região não-relacionada do peptídeo β -A4 ou uma outra, proteína/peptídeo/peptídeo de testes (não-relacionados) relacionados a APP. Desse modo, especificidade pode ser determinada

experimentalmente através de métodos conhecidos na técnica e métodos conforme mostrado e descrito aqui. Tais métodos compreendem, mas não estão limitados a testes Western blots, ELISA-, RIA-, ECL-, IRMA- e escaneamento de peptídeo. Tais métodos também compreendem a determinação de valores K_D conforme, *inter alia*, ilustrado nos exemplos apensos. O escaneamento de peptídeo (ensaio "pepspot") é rotineiramente empregado para mapear epitopos lineares em um antígeno de polipeptídeo. A sequência primária do polipeptídeo é sintetizada sucessivamente em celulose ativada com peptídeo sobrepondo um ao outro. O reconhecimento de certos peptídeos pelo anticorpo a ser testado quanto à sua habilidade em detectar ou reconhecer um antígeno/epitopo específico é registrado através de desenvolvimento de cor de rotina (anticorpo secundário com peroxidase de rábano silvestre e 4-cloronaftol e peróxido de hidrogênio), através de uma reação quimioluminescente ou meios similares conhecidos na técnica. No caso de, *inter alia*, reações de quimioluminescência, a reação pode ser quantificada. Se o anticorpo reage com um certo conjunto de peptídeos se sobrepondo, uma pessoa pode deduzir a sequência mínima de aminoácidos que é necessária para a reação; vide Exemplo 6 ilustrativo e Tabela 2 anexa. O mesmo ensaio pode revelar dois agrupamentos distantes de peptídeos reativos, o que indica o reconhecimento de um epitopo descontínuo, isto é, conformacional, no polipeptídeo antigênico (Geysen (1986), *Mol. Immunol.* 23, 709-715).

[0014] Em adição ao ensaio "pepspot", ensaio ELISA padrão pode ser realizado. Conforme demonstrado no exemplos anexos hexapeptídeos pequenos podem ser acoplados a uma proteína e revestidos em uma imunoplaça e reagidos com anticorpos a serem testados. O registro pode ser realizado através de desenvolvimento de cor padrão (por exemplo, anticorpo secundário com peroxidase de

rábano silvestre e tetrametil benzidina com peróxido de hidrogênio). A reação em certas cavidades é registrada através da densidade óptica, por exemplo, a 450 nm. Base típica (=reação negativa) pode ser 0,1 OD, reação positiva típica pode ser 1 OD. Isto significa que a diferença (razão) positivo/negativo pode ser mais de 10 vezes. Detalhes adicionais são dados nos exemplos anexos. Métodos quantitativos, adicionais, para determinação da especificidade e habilidade de "especificamente reconhecer" as duas regiões aqui definidas do peptídeo β -A4 são dados abaixo.

[0015] O termo "duas regiões do peptídeo β -A4" refere-se a duas regiões conforme definido pelas suas sequências de aminoácido mostradas nas SEQ ID NOs: 1 e 2, com relação aos aminoácidos N-terminais 2 a 10 e aos aminoácidos centrais 12 a 25 do peptídeo β -A4. O termo "peptídeo β -A4" no contexto da presente invenção refere-se a A β 39, A β 41, A β 43 acima descritos, de preferência a A β 40 e A β 42. A β 42 é também mostrado na SEQ ID NO:27 anexa. Deve ser observado que o termo "duas regiões do peptídeo β -A4" também refere-se a um "epitopo" e/ou um "determinante antigênico" que compreende as duas regiões aqui definidas do peptídeo β -A4 ou suas partes. De acordo com a presente invenção, as ditas duas regiões do peptídeo β -A4 são separadas (no nível da sequência de aminoácido) na estrutura primária do peptídeo β -A4 por pelo menos um aminoácido, de preferência por pelo menos dois aminoácidos, com mais preferência por pelo menos três aminoácidos, com mais preferência por pelo menos quatro aminoácidos, com mais preferência por pelo menos cinco aminoácidos, com mais preferência pelo menos seis aminoácidos, com mais preferência pelo menos nove aminoácidos e com mais preferência pelo menos doze aminoácidos. Conforme mostrado aqui e conforme documentado nos exemplos anexos, os anticorpos/moléculas de anticorpo da invenção detectam/interagem

com e/ou se ligam a duas regiões do peptídeo β -A4 conforme aqui definido, com o que as duas regiões são separadas (no nível da estrutura primária da sequência de aminoácido) por pelo menos um aminoácido e onde a sequência separando as ditas duas regiões/"epitopo" pode compreender mais do que dez aminoácidos, de preferência 14 aminoácidos, com mais preferência 15 aminoácidos ou 16 aminoácidos. Por exemplo, Fab MSR-3 (como uma molécula de anticorpo da invenção) reconhece detecta/interage com duas regiões no peptídeo β -A4, com o que a dita primeira região compreende aminoácidos 3 e 4 (EF) e as ditas regiões compreendem aminoácidos 18 a 23 (VFFAED). Desse modo, a sequência que separada entre a região/epitopos a serem detectados/reconhecidos tem um comprimento de 13 aminoácidos na estrutura de sequência de aminoácido primária. Similarmente, IgG1 MSR No.3.4H7, uma molécula de anticorpo otimizada e madura derivada de MSR-3 e compreendida em uma estrutura de IgG1, detecta/interage com/se liga a dois epitopos/regiões de β -A4 que compreendem na primeira região posições 1 a 4 (DAEF) e na segunda região posições 19 a 24 (FFAEDV) de β -A4 conforme aqui definido. Desse modo, IgG1 MSR No.3.4H7 reconhece/detecta/interage com/se liga a dois epitopos/regiões que são, no nível de sequência de aminoácido primária, separados por 14 aminoácidos. Conforme detalhado nos exemplos anexos, maturação de afinidade e conversão de fragmentos Fab da invenção monovalentes em anticorpos IgG1 de comprimento completo podem resultar em uma certa ampliação dos epitopos/regiões detectados no "pepspot", ensaios ELISA e etc. Desse modo, as moléculas de anticorpo da invenção são capazes de simultaneamente e independentemente reconhecer duas regiões do peptídeo β -A4/ β 4 onde as ditas regiões compreendem a sequência de aminoácido conforme mostrado na SEQ ID NO:1 (ou suas partes) e

a sequência de aminoácido conforme mostrado na SEQ ID NO:2 (ou (uma) parte(es) dela). Devido à ampliação potencial de epitopos conforme detalhado aqui é, no entanto, também imaginado que os aminoácidos em proximidade grande com as sequências das SEQ ID NOs: 1 e 2 sejam detectadas/reconhecidas, isto é, que os aminoácidos adicionais são partes das duas regiões a serem detectadas/reconhecidas. Desse modo, é também imaginado que, por exemplo, o primeiro aminoácido de A β (1-42) conforme aqui definido, a saber D (ácido aspártico) em parte de um epitopo a ser detectado/reconhecido, ou aqueles aminoácidos localizados após a região de A β (1-42) conforme definido na SEQ ID NO:2 sejam detectados/reconhecidos. O dito aminoácido adicional pode ser, por exemplo, o aminoácido na posição 26 da SEQ ID NO:27 (β A4/A β (1-42)), a saber S (Serina).

[0016] O termo pode também se referir a um epitopo conformacional, um epitopo estrutural ou um epitopo descontínuo consistindo nas duas regiões ou partes delas; vide também Geysen (1986); loc. cit. No contexto da presente invenção, um epitopo conformacional é definido por duas ou mais sequências de aminoácido diferentes separadas na sequência primária que se unem na superfície quando o polipeptídeo se transforma na proteína nativa (Sela (1969) *Science* 166, 1365 e Laver (1990) *Cell* 61, 553-6). As moléculas de anticorpo da presente invenção são imaginadas especificamente se ligarem a/interagir com um(ns) epitopo(s) conformacional(is)/estrutural(is) composto(s) de e/ou compreendendo as duas regiões de β -A4 descritas aqui ou suas partes conforme descrito abaixo. As "moléculas de anticorpo" da presente invenção são imaginadas compreender uma especificidade dual simultânea e independente para (a) um prolongamento de aminoácido compreendendo os aminoácidos 2 a 10 (ou (a) sua(s) parte(s)) de β -A4

e (b) um prolongamento de aminoácido compreendendo os aminoácidos 12 a 25 (ou (a) sua(s) parte(s)) de β -A4 (SEQ ID NO:27). Fragmentos ou partes desses prolongamentos compreendem pelo menos dois, com mais preferência pelo menos três, aminoácidos. Os fragmentos ou partes preferidos estão na primeira região/prolongamento da SEQ ID NO:27 das sequências de aminoácido AEFRHD, EF, EFR, FR, EFRHDSG, EFRHD ou HDSG e na segunda região/prolongamento da SEQ ID NO:27 da sequência de aminoácido HHQKL, LV, LVFFAE, VFFAED, VFFA ou FFAEDV. Conforme acima mencionado, os ditos fragmentos podem compreender também mais aminoácidos ou podem ser partes dos fragmentos definidos aqui. Exemplos específicos são DAE, DAEF, FRH ou RHDSG.

[0017] Vários anticorpos que especificamente reconhecem peptídeos $A\beta$ foram descritos na técnica. Esses anticorpos foram principalmente obtidos através de imunização de animais com $A\beta$ 1-40 ou $A\beta$ 1-42 ou seus fragmentos usando tecnologias padrão. De acordo com os dados publicados, anticorpos monoclonais que foram gerados através de imunização com o peptídeo $A\beta$ completo (1-40 ou 1-42) reconhecem exclusivamente um epítipo próximo ao N-terminal de $A\beta$. Ainda, exemplos são os anticorpos BAP-1 e BAP-2 (Brockhaus, não-publicado) que foram gerados através de imunização de camundongos com $A\beta$ 1-40 e que reconhecem os aminoácidos 4-6 no contexto de peptídeos $A\beta$ maiores; Vide Exemplo 7, Tabela 2 e Exemplo 12, Tabela 7 anexos. Anticorpos que reconhecem a parte média de $A\beta$ derivam de imunizações com peptídeos menores. Por exemplo, o anticorpo 4G8 foi gerado através de imunização com o peptídeo $A\beta$ 1-24 e reconhece exclusivamente a sequência 17-24 (Kimm (1988) *Neuroscience Research Communications* 2, 121-130). Muitos outros anticorpos monoclonais foram gerados através de imunização dos

camundongos com fragmentos derivados de A β , e anticorpos reconhecendo a extremidade C terminal de A β 1-40 e A β 1-42 são amplamente usados para distinguir e quantificar os peptídeos A β correspondentes em fluidos biológicos e tecidos através de ELISA, Western blot e análise imunohistoquímica (Ida e outros (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 22908-22914; Johnson-Wood e outros, (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1994), 1550-1555; Suzuki e outros (1994) *Science* 264, 1336-1340; Brockhaus (1998), *Neuro. Rep.* 9, 1481-1486). BAP-17 é um anticorpo monoclonal de camundongo que foi gerado através de imunização dos camundongos com fragmento de A β 35-40. Ele reconhece especificamente o C-terminal de A β 1-40 (Brockhaus (1998) *Neuroreport* 9, 1481-1486).

[0018] Acredita-se que a imunização com antígenos dependentes de célula T (muitas vezes imunógenos pobres) requer uma clivagem proteolítica do antígeno nos endossomas de células apresentando antígeno. A seleção *in vivo* de anticorpos de alta afinidade após imunização é direcionada pelo contato de células T auxiliares com células apresentando antígeno. As células apresentando antígeno apenas apresentam peptídeos curtos e não polipeptídeos de tamanho grande. Desse modo, essas células têm um mecanismo complicado (mas bem conhecido) para endocitose do(s) antígeno(s), degradar o(s) antígeno(s) nos endossomas, combinar peptídeos selecionados com moléculas da classe I de MHC adequadas e exportar o complexo peptídeo-MHC para a superfície celular. Aqui é onde o reconhecimento específico de antígeno pelas células T acontece, com o objetivo de prover auxílio para maturação de células B. As células B que recebem a maior parte da ajuda da célula T têm a melhor chance de se desenvolverem em células de secreção de anticorpo e de proliferarem. Isso mostra que o processamento de antígeno pela proteólise é uma etapa importante para a geração de uma resposta de anticorpo de alta

afinidade *in vivo* e pode explicar a dominância do epitopo A β N-terminal nos anticorpos monoclonais e policlonais da técnica anterior derivados através de imunização. Em contraste, a seleção de anticorpos/moléculas de anticorpo da presente invenção é direcionada pela aderência física de fagos expressando Fab ao antígeno. Não há nenhuma degradação do antígeno envolvido neste processo de seleção *in vitro*. Os fagos que expressam o Fab com a maior afinidade para o antígeno são selecionados e propagados. Uma biblioteca sintética conforme empregado nos exemplos anexos para selecionar moléculas de anticorpo específicas de acordo com a presente invenção é particularmente adequada para evitar qualquer propensão a epitopos simples, contínuos, que são muitas vezes encontrados em bibliotecas derivadas de células B imunizadas.

[0019] Deve ser observado que a técnica anterior não descreveu moléculas de anticorpo reconhecendo duas regiões independentes de A β 4 que especificamente reconhecem (a) epitopo(s) descontínuo(s)/estrutural(is)/conformacional(is) e/ou que são capazes de simultaneamente e independentemente reconhecer duas regiões/epitopos de A β 4. Vacinação de camundongos transgênicos superexpressando APP humana mutante V_{717F} (camundongos PDAPP) com A β 1-42 resultou em prevenção quase que completa de deposição de amiloide no cérebro quando tratamento foi iniciado em animais jovens, isto é, antes do início de neuropatologias, enquanto que em animais mais velhos uma redução de placas já formadas foi observada sugerindo desobstrução mediada por anticorpo de placas (Schenk e outros (1999), *Nature* 400, 173-177). Os anticorpos gerados por esse procedimento de imunização eram reativos contra o N-terminal de A β 4 cobrindo um epitopo em torno dos aminoácidos 3-7 (Schenk e outros (1999), loc. cit.; WO 00/72880). Imunização ativa com A β 1-42 também reduziu o dano comportamental e perda de

memória em modelos transgênicos diferentes para Doença de Alzheimer (Janus e outros (2000) *Nature* 408, 979-982; Morgan e outros (2000) *Nature* 408, 982-985). Estudos subsequentes com anticorpos periféricamente administrados, isto é, imunização passiva, confirmaram que anticorpos podem entrar no sistema nervoso central, decorar placas e induzir desobstrução de placas amiloide preexistentes em camundongos transgênicos APP (camundongos PDAPP) (Bard e outros (2000) *Nat. Med.* 6, 916-919; WO 00/72880). Nesses estudos, os anticorpos monoclonais com a eficácia *in vivo* e *ex vivo* mais potente (iniciação de fagocitose em células microgliais exógenas) eram aqueles que reconheceram epitopos N-terminais A β 1-5 (mab 3D6, IgG2b) ou 3-6 (mab 10D5, IgG1). Da mesma maneira, anticorpos policlonais isolados de camundongos, coelhos ou macacos após imunização com A β 1-42 mostraram uma especificidade de epitopo N-terminal similar e eram também eficazes na iniciação de fagocitose e em desobstrução de placa *in vivo*. Em contraste, anticorpos específicos C-terminais se ligando a A β 1-40 ou A β 1-42 com alta afinidade não induziram fagocitose no ensaio *ex vivo* e não foram eficazes *in vivo* (WO 00/72880). Anticorpo monoclonal m266 (WO 00/72880) foi criado contra A β 13-28 (domínio central de A β) e mapeamento de epitopo confirmou a especificidade de anticorpo cobrir os aminoácidos 16-24 na sequência de A β . Este anticorpo não se liga bem a A β agregado e depósitos de amiloide e apenas reage com A β solúvel (monomérico), isto é, propriedades que são similares a um outro anticorpo monoclonal bem conhecido e comercialmente disponível (4G8; Kim (1988) *Neuroscience Research Communications* 2, 121-130; comercialmente disponível da Signet Laboratories Inc. Dedham, MA U.S.A.) que reconhece o mesmo epitopo.

[0020] *In vivo*, o anticorpo m266 foi recentemente verificado reduzir bastante a deposição de A β em camundongos PDAPP após

administração periférica (DeMattos (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 8850-8855). No entanto, e em contraste com os anticorpos específicos N-terminais, m266 não decorou placas amiloide *in vivo*, e foi então tido como hipótese que a queima de A β no cérebro foi reduzida por uma mudança induzida por anticorpo no equilíbrio entre CNS e A β no plasma resultando no acúmulo de A β derivado do cérebro na periferia, firmemente complexado ao m266 (DeMattos (2001) loc. cit.).

[0021] Os anticorpos/moléculas de anticorpo da presente invenção, através de ligação simultaneamente (por exemplo, em um epítipo estrutural/conformacional formado pela região N-terminal e central de β A4 conforme aqui descrito) e independentemente (por exemplo, em ensaios "pepspot" conforme documentado na parte experimental anexa) aos epítipos N-terminais e centrais, combinam as propriedades de um anticorpo específico N-terminal e um anticorpo específico de epítipo central em uma única molécula. Anticorpos com a especificidade de epítipo dupla, conforme descrito na presente invenção, são considerados ser mais eficazes *in vivo*, em particular em ambientes médicos e de diagnóstico, por exemplo, redução da queima de placa amiloide ou amiloidogênese ou para a detecção de depósitos e placas amiloide. É bem sabido que no processo de agregação de A β 4 e deposição de amiloide, mudanças conformacionais podem acontecer, e embora o epítipo central seja facilmente acessível em A β 4 solúvel ele parece estar escondido e menos reativo em A β 4 agregado ou fibrilar. O fato de que o anticorpo m266 específico de epítipo central/médio é eficaz *in vivo* indica que a neutralização de A β 4 solúvel pode ser também um parâmetro crítico. Os anticorpos/moléculas de anticorpo da presente invenção, devido à especificidade de epítipo dupla, podem se ligar a ambos A β 4 fibrilar e solúvel com eficácia similar, desse modo permitindo a interação com

placas amiloide bem como neutralização de A β 4 solúvel. O termo "simultaneamente e independentemente se ligando aos epitopos N-terminais e centrais/médios de β -A4" conforme empregado aqui no contexto das moléculas de anticorpo da invenção refere-se ao fato de que os anticorpos/moléculas de anticorpo descritos aqui podem detectar e/ou se ligar a ambos epitopos simultaneamente, isto é, ao mesmo tempo (por exemplo, em epitopos conformacionais/estruturais formados pelo epitopo N-terminal (ou (uma) parte(s) dele) e epitopos centrais (ou (uma) parte(s) dele) de β A4 conforme aqui definido) e que as mesmas moléculas de anticorpo, no entanto, são também capazes de detectar/se ligar a cada um dos epitopos definidos de uma maneira independente, como *inter alia*, demonstrado na análise "pepspot" mostrada nos exemplos.

[0022] Desobstrução de placas amiloide *in vivo* em camundongos PDAPP após aplicação direta dos anticorpos ao cérebro não é dependente do subtipo de IgG e pode também envolver um mecanismo que não é Fc mediado, isto é, nenhum envolvimento de microglia ativada em desobstrução de placa (Bacskai (2001) *Abstract Society for Neuroscience* 31^o Annual Meeting, Novembro 10-15, 2001, San Diego). Esta observação está em contraste com o que foi postulado em um estudo anterior por Bard (2000) loc. cit.

[0023] Em um outro estudo, anticorpos criados contra peptídeos A β 1-28 e A β 1-16 foram verificados ser eficazes na desagregação de fibrilas de A β *in vitro*, enquanto que um anticorpo específico para A β 13-28 era muito menos ativo neste ensaio (Solomon (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 4109-4112). Prevenção de agregação de A β por um anticorpo anti-A β 1-28 (AMY-33) foi também descrita (Solomon (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 452-455). No mesmo estudo, o anticorpo 6F/3D que foi criado contra o fragmento de A β 8-17 interferiu ligeiramente com a agregação de A β induzida por Zn²⁺ mas não tinha

nenhum efeito sobre a auto-agregação induzida por outros agentes de indução de agregação. A eficácia dos vários anticorpos nesses ensaios *in vitro* se relaciona com a capacidade de acesso de seus epitopos em agregados de A β 4. O N-terminal é exposto e os anticorpos N-terminais específicos claramente induzem despolimerização, enquanto que a região central e o C-terminal são escondidos e não são facilmente acessíveis e desse modo anticorpos contra esses epitopos são muito menos eficazes. Investigações com relação à capacidade de acesso de epitopo para anticorpos mostraram que no A β agregado o epitopo N-terminal é exposto e reage com o anticorpo BAP-1, enquanto que o epitopo médio ou central na verdade permanece críptico, isto é, nenhuma ligação do anticorpo 4G8 foi observada. No entanto, em A β monomérico ambos epitopos são evidentes e são igualmente reconhecidos por ambos anticorpos da técnica anterior.

[0024] Em contraste, na presente invenção, foi surpreendentemente verificado que as moléculas de anticorpo aqui descritas reconhecem duas sequências de aminoácido descontínuas, por exemplo, um epitopo conformacional/estrutural no peptídeo A β . Duas "sequências de aminoácido descontínuas" de acordo com a presente invenção significa que as ditas duas sequências de aminoácido que formam os epitopos N-terminal e central/médio, respectivamente, são separadas em β -A4 em sua estrutura primária por pelo menos dois aminoácidos que não são parte de nenhum epitopo.

[0025] A área de ligação de um Fab de anticorpo (=paratopo) ocupa uma superfície molecular de aproximadamente 30 x 30 Å de tamanho (Laver, *Cell* 61 (1990), 553-556). Isso é suficiente para contatar 15 a 22 resíduos de aminoácido que podem estar presentes em várias alças de superfície. O epitopo descontínuo reconhecido

pelas moléculas de anticorpo da invenção lembra uma conformação onde as sequências de peptídeo A β N-terminal (resíduos 2 a 10 ou partes deles) e médio (resíduos 12 a 25 ou suas partes) estão em grande proximidade. Apenas dentro desta conformação, o número máximo de contatos de antígeno-anticorpo e o estado de energia livre mais baixo são obtidos. Com base em cálculos energéticos foi sugerido que um subconjunto menor de 5-6 resíduos, que não são arrumados em uma sequência linear mas estão espalhados na superfície do epitopo, contribui com a maior parte da energia de ligação enquanto que resíduos circundantes podem apenas constituir uma disposição complementar (Laver (1990) loc. cit.).

[0026] Os anticorpos/moléculas de anticorpo da invenção são capazes de se ligarem a A β agregado e reagem fortemente com placas amiloide no cérebro de pacientes AD (conforme documentado nos exemplos anexos). Em adição, eles são capazes de despolimerizar/desintegrar agregados de amiloide.

[0027] Sem ser limitado pela teoria, o epitopo conformacional/estrutural (composto por duas regiões de A β 4 ou (uma) parte(s) das ditas regiões conforme aqui descrito) é acreditado ser parcialmente exposto em A β agregado. No entanto, é sabido que a maior parte do epitopo/região médio/segundo sozinho não é livremente acessível nesses agregados de A β (com base em reatividades pobres de anticorpos específicos de epitopo médio 4G8 e m266). Por outro lado, e em vista das considerações mencionadas acima, é provável que um ou vários resíduos da região média sejam componentes do epitopo conformacional e, em conjunto com os resíduos da região N-terminal, são acessíveis aos anticorpos da presente invenção, desse modo contribuindo significativamente para a energia de ligação da interação de anticorpo-A β 4. A reatividade das moléculas de anticorpo da invenção com o epitopo conformacional em A β agregado é então

única e claramente diferente de anticorpos α -A β 4 descritos na técnica anterior. Ainda, conforme apontado acima, uma característica única dos anticorpos/moléculas de anticorpo da invenção é sua capacidade de simultaneamente e independentemente se ligarem a/reconhecerem dois epítopos separados em β -A4, conforme aqui definido e nos exemplos anexos.

[0028] Em uma modalidade preferida da invenção, a molécula de anticorpo da invenção é uma molécula de anticorpo onde pelo menos duas regiões do β -A4 a ser especificamente reconhecido pelo dito anticorpo formam um epítopo conformacional/estrutural ou um epítopo descontínuo; vide Geysen (1986), loc. cit.; Ghoshal (2001) *J. Neurochem.* 77, 1372;1385; Hochleitner (2000) *J. Imm.* 164, 4156-4161; Laver (1990), loc. cit. O termo "epítopo descontínuo" significa no contexto da invenção epítopos não-lineares que são montados a partir de resíduos de porções distantes da cadeia de polipeptídeo. Esses resíduos se juntam na superfície quando a cadeia de polipeptídeo se transforma em uma estrutura tridimensional para constituir um epítopo conformacional/estrutural. A presente invenção provê epítopos preferidos, inesperados, dentro de β -A4, que resultam na geração da invenção de moléculas de anticorpo específicas, capazes de especificamente interagir com esses epítopos. Esses anticorpos/moléculas de anticorpo da invenção provêm a base para maior eficácia, e um potencial reduzido para efeitos colaterais. Conforme acima mostrado, os anticorpos da invenção, no entanto, eram também capazes de independentemente interagir com cada uma das duas regiões/epítopos definidos de β -A4, por exemplo, nos ensaios "pepspot" conforme documentado nos exemplos anexos.

[0029] A presente invenção, desse modo, provê ferramentas únicas que podem ser empregadas para despolimerizar fibrilas de A β agregadas *in vivo* e *in vitro* e/ou que são capazes de estabilizar e/ou

neutralizar um epítipo conformacional de A β monomérico e desse modo capaz de prevenir a agregação de A β patológica.

[0030] É ainda imaginado que os anticorpos da invenção se liguem a depósitos de A β na extremidade de placas amiloide em, *inter alia*, cérebro de Alzheimer e eficientemente dissolvam as protofibrilas e fibrilas patológicas.

[0031] Em uma modalidade preferida, a molécula de anticorpo da invenção reconhece pelo menos dois aminoácidos consecutivos dentro das duas regiões de A β 4 aqui definidas, com mais preferência a dita molécula de anticorpo reconhece na primeira região uma sequência de aminoácido compreendendo os aminoácidos: AEFRHD, EF, EFR, FR, EFRHDSG, EFRHD ou HDSG e na segunda região uma sequência de aminoácido compreendendo os aminoácidos: HHQKL, LV, LVFFAE, VFFAED, VFFA ou FFAEDV. Fragmentos adicionais ou partes ampliadas compreendem: DAE, DAEF, FRH ou RHDSG.

[0032] É particularmente preferido que a molécula de anticorpo da invenção compreenda uma região V_H- variável conforme codificado por uma molécula de ácido nucléico conforme mostrado na SEQ ID NO:3, 5 ou 7 ou uma região V_H- variável conforme mostrado nas sequências de aminoácido mostradas na SEQ ID NO: 4, 6 ou 8. As sequências conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 3 e 4 mostram a região de codificação e a sequência de aminoácido, respectivamente, da região V_H- do anticorpo MSR-3 de origem, da invenção, (MS-Roche 3), as sequências nas SEQ ID NOs: 5 e 6 mostram a região de codificação e a sequência de aminoácido, respectivamente, da região V_H- da invenção, anticorpo MSR-7 de origem (MS-Roche 7) e SEQ ID NOs: 7 e 8 mostram a região de codificação da sequência de aminoácido, respectivamente, da região V_H- do anticorpo MSR-8 de origem, da invenção, (MS-Roche 8). Desse modo, a invenção também provê moléculas de anticorpo que compreendem uma região V_L- variável

conforme codificado por uma molécula de ácido nucléico conforme mostrado em uma SEQ ID NO selecionada do grupo consistindo na SEQ ID NO:9, 11 ou 13 ou uma região V_L- variável conforme mostrado nas sequências de aminoácido mostradas na SEQ ID NO: 10, 12 ou 14. As SEQ IS NOs: 9 e 10 correspondem à região V_L- de MSR-3, as SEQ ID NOs: 11 e 12 correspondem à região V_L- de MSR-7 e a SEQ ID NOs: 13 e 14 correspondem à região V_L- de MSR-8. Conforme ilustrado nos exemplos anexos, os anticorpos de origem MSR-3, -7 e -8 são empregados para gerar mais moléculas de anticorpo otimizadas com propriedades e/ou afinidades de ligação ainda melhores. Algumas das estratégias correspondentes e possíveis são exemplificadas e mostradas nos exemplos anexos.

[0033] A estratégia de otimização conforme ilustrado nos exemplos anexos leva a uma pluralidade de anticorpos otimizados da invenção. Esses anticorpos otimizados compartilham com seus anticorpos de origem o domínio CDR-3 da região V_H-. Enquanto a região de estrutura principal original (conforme mostrado na Figura 1 anexa) permanece a mesma, nas moléculas de anticorpo maduras/otimizadas, as regiões V_L CDR1, CDR2 e/ou CDR-3 são modificadas. Motivos de sequência ilustrativos, modificados, para moléculas de anticorpo otimizadas são mostrados na Tabela 1 em anexo. Desse modo, dentro do escopo da presente invenção estão também moléculas de anticorpo otimizadas que são derivadas dos MSR-3, -7 e -8 descritos aqui e que são capazes de especificamente reagir com/especificamente reconhecer as duas regiões do peptídeo β-A4 conforme aqui definido. Em particular, as regiões CDR, de preferência CDR1s, com mais preferência CDR1s e CDR2s, com mais preferência CDR1s, CDR2s e CDR3s conforme aqui definido podem ser empregadas para gerar mais anticorpos/moléculas de anticorpo da invenção, *inter alia*, através de métodos de enxerto de CDR

conhecidos na técnica; vide Jones (1986), *Nature* 321, 522-515 ou Riechmann (1988), *Nature* 332, 323-327. Com mais preferência, os anticorpos/moléculas de anticorpo da invenção bem como fragmentos ou derivados de anticorpo são derivados dos anticorpos de origem conforme descrito aqui e compartilham, conforme descrito acima, o domínio CDR-3 da região V_H com pelo menos um dos ditos anticorpos de origem. Conforme ilustrado abaixo, é também imaginado que anticorpos clonados de forma cruzada sejam gerados, os quais devem ser considerados como anticorpos/moléculas de anticorpo otimizados/amadurecidos da presente invenção. Desse modo, as moléculas de anticorpo preferidas podem também compreender ou podem ser também derivadas de anticorpos/moléculas de anticorpo que são caracterizadas por regiões V_H conforme mostrado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 32 a 45 ou regiões V_L conforme mostrado na SEQ ID NOs: 46 a 59 ou que podem compreender uma região de CDR-3 conforme definido em qualquer uma das SEQ ID NOs: 60 a 87. Em uma modalidade preferida particular, a molécula de anticorpo otimizada da presente invenção compreende regiões V_H e regiões V_L conforme mostrado nas SEQ ID NOs: 88/89 e 90/91, respectivamente, ou suas partes. Separadamente delas pode(m) ser (uma(s)) região(ões) CDR, de preferência (uma) região(ões) CDR-3. Uma molécula de anticorpo particularmente preferida do tipo otimizado compreende uma H-CDR3 conforme caracterizado na SEQ ID NO: 92 ou 93 e/ou uma L-CDR3 conforme caracterizado na SEQ ID NO:94 ou 95. É preferido que os anticorpos/moléculas de anticorpo da invenção sejam caracterizados pela sua reatividade específica com β -A4 e/ou peptídeos derivados do dito β -A4. Por exemplo, densidades ópticas em testes ELISA, conforme ilustrado nos exemplos anexos, podem ser estabelecidas e a razão de densidades ópticas pode ser empregada para definir a reatividade específica dos anticorpos de origem ou

otimizados. Desse modo, um anticorpo preferido da invenção é um anticorpo que reage em um teste ELISA com β -A4 para se chegar a uma densidade óptica medida a 450 nm que é 10 vezes maior do que a densidade óptica medida sem β -A4, isto é, 10 vezes a base. De preferência, a medição da densidade óptica é realizada em alguns minutos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 minutos) após início da reação de desenvolvimento de cor a fim de otimizar o sinal para razão de base.

[0034] Em uma modalidade particular preferida, a molécula de anticorpo da invenção compreende pelo menos uma CDR3 de uma região V_L conforme codificado por uma molécula de ácido nucléico conforme mostrado na SEQ ID NO: 15, 17 ou 19 ou pelo menos uma sequência de aminoácido de CDR3 de uma região V_L conforme mostrado na SEQ ID NO: 16, 18 ou 20 e/ou a dita molécula de anticorpo compreende pelo menos uma CDR3 de uma região V_H conforme codificado por uma molécula de ácido nucléico conforme mostrado na SEQ ID NO: 21, 23 ou 25 ou pelo menos uma sequência de aminoácido de CDR3 de uma região V_H conforme mostrado na SEQ ID NO: 22, 24 ou 26. Mais preferidos são os anticorpos compreendendo pelo menos uma CDR3 de uma região V_H conforme aqui definido. Os domínios de CDR3 mencionados aqui acima referem-se às moléculas MSR-3, -7 ou -8 de anticorpo de origem ilustrativas da invenção. No entanto, conforme ilustrado na Tabela 1, 8 ou 10, moléculas de anticorpo maduras e/ou otimizadas que podem ser obtidas através dos métodos descritos nos exemplos anexos podem compreender regiões V_H , V_L , CDR1, CDR2 e CDR3 modificadas. Desse modo, a molécula de anticorpo da invenção é de preferência selecionada do grupo consistindo em MSR-3, -7 e -8 ou uma versão de afinidade-madura de MSR-3, -7 ou -8. Versões de afinidade-madura bem como de clonagem cruzada de MSR-3, -7 e -8

compreendem, *inter alia*, moléculas de anticorpo compreendendo as regiões CDR1, CDR2 e/ou CDR3 conforme mostrado na Tabela 1 ou 8 ou caracterizadas em qualquer uma das SEQ ID NOs: 15 a 20, 21 a 26, 60 a 74, 75 a 87, 92 e 93 ou 94 e 95 bem como nas SEQ ID NOs: 354 a 413. Com mais preferência, o anticorpo da invenção compreende pelo menos uma CDR, de preferência uma CDR1, com mais preferência uma CDR2, com mais preferência uma CDR3 conforme mostrado nas Tabela 1, 8 anexa ou conforme documentado na Tabela 10 anexa.

[0035] É observado que as técnicas de maturação de afinidade são conhecidas na técnica, descritas nos exemplos anexos e, *inter alia*, em Knappik (2000) *J. Mol. Biol.* 296, 55; Krebs (2000), *J. Imm. Meth.* 254, 67-84; WO 01/87337; WO 01/87338; U.S. 6.300.064; EP 96 92 92 78.8 e ainda referências citadas abaixo.

[0036] Em uma modalidade mais preferida da invenção, a molécula de anticorpo é um anticorpo completo (imunoglobulina, tal como um IgG1, um IgG2, um IgG2b, um IgG3, um IgG4, um IgA, um IgM, um IgD ou um IgE), um fragmento F(ab)-, Fabc-, Fv-, Fab'-, F(ab')₂-, um anticorpo de cadeia simples, um anticorpo quimérico, um anticorpo enxertado com CDR, uma construção de anticorpo bivalente, uma proteína de fusão de anticorpo, um anticorpo clonado de forma cruzada ou um anticorpo sintético. Também imaginadas são variantes genéticas de genes de imunoglobulina. Variantes genéticas de, por exemplo, subclasse 1 de cadeia G pesada de imunoglobulina (IgG1) podem compreender os marcadores alotípicos G1m(17) ou G1m(3) no domínio CH1, ou o marcador alotípico G1m(1) ou o G1m(não-1) no domínio CH3. A molécula de anticorpo da invenção também compreende anticorpos modificados ou mutantes, tais como IgG mutante com ligação do receptor Fc aumentada ou atenuada ou ativação de complemento. É também imaginado que os anticorpos da

invenção sejam produzidos através de meios convencionais, por exemplo, a produção de anticorpos monoclonais específicos gerados por imunização de mamíferos, de preferência camundongos, com peptídeos compreendendo as duas regiões de β A4 conforme aqui definido, por exemplo, a região/epitopo N-terminal e central compreendendo (a) aminoácidos 2 a 10 (ou (uma) parte(s) dele) de β -A4 e (b) um prolongamento de aminoácido compreendendo aminoácidos 12 a 25 (ou (uma) parte(s) dele) de β -A4 (SEQ ID NO:27). Desse modo, a pessoa versada na técnica pode gerar anticorpos monoclonais contra tal peptídeo e pode avaliar os anticorpos obtidos quanto à capacidade de simultaneamente e independentemente se ligarem a/reagir com a região/epitopo N-terminal e central de β A4 conforme definido aqui. Métodos de avaliação correspondentes são descritos nos exemplos anexos.

[0037] Conforme ilustrado nos exemplos anexos, os anticorpos/moléculas de anticorpo da invenção podem imediatamente e de preferência ser recombinantemente construídos e expressos. De preferência, a molécula de anticorpo da invenção compreende pelo menos um, com mais preferência pelo menos dois, de preferência pelo menos três, com mais preferência pelo menos quatro, com mais preferência pelo menos cinco e com mais preferência seis CRDs dos anticorpos de origem MSR-3, MSR-7 ou MSR-8 aqui definidos ou de anticorpos de afinidade madura/otimizados derivados dos ditos anticorpos de origem. Deve ser observado que também mais de seis CDRs podem estar compreendidas em anticorpos recombinantemente produzidos da invenção. A pessoa versada na técnica pode empregar imediatamente a informação dada nos exemplos anexos para deduzir as CDRs correspondentes dos anticorpos de origem bem como dos anticorpos de afinidade otimizados. Exemplos de anticorpos otimizados que foram obtidos através de maturação/otimização dos

anticorpos de origem são, *inter alia*, mostrados na Tabela 1 anexa. Uma molécula de anticorpo amadurecida/otimizada da invenção é, por exemplo, MSR 7,9H7 que é também caracterizada pelas sequências anexas aqui, as quais compreendem as SEQ ID NOs: 88 a 95 e que mostram a região V_H- de MSR 7.9H7 (SEQ ID NOs: 88 e 89), a região V_L- de MSR 7.9H7 (SEQ ID NOs: 90 e 91), a H-CDR3 de MSR 7.9H7 (SEQ ID NOs: 92 e 93) bem como L-CDR3 de MSR 7.9H7 (SEQ ID NOs: 94 e 95). A molécula de anticorpo ilustrativa 7.9H7 é derivada do anticorpo de origem MSR7 e é um exemplo preferido particular da invenção de uma molécula de anticorpo otimizada/amadurecida da presente invenção. Esta molécula de anticorpo pode ser ainda modificada de acordo com a presente invenção, por exemplo, na forma de clonagem cruzada, vide abaixo e exemplos anexos.

[0038] Conforme documentado nos exemplos anexos, os anticorpos da invenção também compreendem anticorpos clonados de forma cruzada, isto é, anticorpos compreendendo regiões de anticorpo diferentes (por exemplo, regiões CDR) de um ou mais anticorpos de origem ou de afinidade-otimizados conforme aqui descrito. Esses anticorpos clonados de forma cruzada podem ser anticorpos em várias estruturas principais diferentes, com o que a estrutura principal mais preferida é uma estrutura principal de IgG, com mais preferência em uma estrutura principal IgG1-, IgG2a ou uma IgG2b. É particularmente preferido que a dita estrutura principal do anticorpo seja um mamífero, com mais preferência uma estrutura principal humana. Os domínios das cadeias leves e pesadas têm a mesma estrutura geral e cada domínio compreende quatro regiões de estrutura principal, cujas sequências são relativamente conservadas, unidas por três domínios hipervariáveis conhecidos como regiões de determinação de complementariedade (CDR1-3).

[0039] Conforme aqui usado, uma "região de estrutura principal

humana" refere-se a uma região de estrutura principal que é substancialmente idêntica (cerca de 85% ou mais, geralmente 90-95% ou mais) à região da estrutura principal de uma imunoglobulina humana de ocorrência natural. A região da estrutura principal de um anticorpo, isto é, as regiões de estrutura principal combinadas das cadeias leves e pesadas constituintes, serve para posicionar e alinhar as CDR's. As CDR's são principalmente responsáveis pela ligação a um epítipo de um antígeno. Deve ser observado que não apenas anticorpos clonados de forma cruzada descritos aqui podem estar presentes em uma estrutura principal de anticorpo preferida (humana), mas também moléculas de anticorpo compreendendo CDRs dos, *inter alia*, anticorpos de origem MSR-3, -7 ou -8 conforme descrito aqui ou de anticorpos amadurecidos derivados dos ditos anticorpos de origem, podem ser introduzidas em uma estrutura principal de imunoglobulina. As estruturas principais preferidas são IgG1, IgG2a e IgG2b. Mais preferidas são estruturas principais humanas e estruturas principais de IgG1 humano.

[0040] Conforme mostrado nos exemplos anexos, é, *inter alia*, possível transferir, através de engenharia genética conhecida da técnica, cadeias leves inteiras de um clone doador otimizado para um clone recipiente otimizado. Exemplo para um clone doador otimizado é, por exemplo, L-CDR1 (L1) e um exemplo de um clone recipiente otimizado é H-CDR2 (H2). A especificidade do epítipo pode ser conservada combinando clones que possuem as mesmas regiões de H-CDR-3. Detalhes adicionais são dados no Exemplo 13 ilustrativo. As moléculas de anticorpo clonadas com cruzamento preferidas da invenção são selecionadas do grupo consistindo em MS-R No.3.3H1x3.4L9, MS-R No.3.4H1x3.4L9, MS-R No.3.4H3x3.4L7, MS-R No.3.4H3x3.4L9, MS-R No.3.4H7x3.4L9, MS-R No.3.4H7x3.4L7, MS-R No.3.6H5x3.6L1, MS-R No.3.6H5x3.6L2, MS-R No.3.6,H8x3.6L2, MS-

R No.7.2H2x7.2L1, MS-R No.7.4H2x7.2L1, MS-R No.7.4H2x7.12L2, MS-R No.7.9H2x7.2L1(L1), MS-R No.7.9H2x7.12L1, MS-R No.7.9H2x7.12L2, MS-R No.7.9H2x7.12L2(L1 +2), MS-R No.7.9H4x7.12,L2, MS-R No.7.11H1x7.2L1, MS-R No.7.11H1x7.11L1, MS-R No.7.11 H2x7.2L1 (L1), MS-R No.7.11 H2x7.9L1 (L1), MS-R No.7.11 H2x7.12L1 ou MS-R No.8.1 H1 x8.2L1.

[0041] A geração dos anticorpos clonados de forma cruzada é também ilustrada nos exemplos anexos. Os anticorpos clonados de forma cruzada/moléculas de anticorpo preferidos mencionadas acima são moléculas de anticorpo otimizadas/maduras derivadas de anticorpos de origem descritos aqui, em particular de MSR-3 e MSR-7. Ainda, sequências de CDR de caracterização adicional e regiões V das moléculas de anticorpo/anticorpos clonados de forma cruzada são dadas nas SEQ ID NOs: 32, 33, 46 e 47 anexas (MSR 3.6H5x3.6,L2; regiões V_H, V_L); 34, 35, 48 e 49 (MSR 3.6H8x3.6,L2; regiões V_H, V_L); 36, 37, 50 e 51 (MSR 7.4H2x7.2,L1; regiões V_H, V_L); 38, 39, 52 e 53 (MSR 7.9H2x7.12,L2; regiões V_H, V_L); 40, 41, 54 e 55 (MSR No. 7.9H4x7.12,L2; regiões V_H, V_L); 42, 43, 56 e 57 (MSR No.7.11 H1x7.11,L1; regiões V_H, V_L); e 44, 45, 58 e 59 (MSR No. 7.11 H1 x7.2,L1; regiões V_H, V_L). Regiões CDR3 correspondentes dessas moléculas de anticorpo clonado de forma cruzada preferidas particulares são mostradas nas SEQ ID NOs: 60 a 87. Para mais moléculas de anticorpo MSR, regiões V_H, V_L, CDR podem ser deduzidas da Tabela 8 ou 10 anexa e da listagem de sequência anexa, em particular SEQ ID NOs: 32 a 95 para anticorpos/moléculas de anticorpo MS-R No.3.6H5x3.6L2, No.3.6H8x3.6L2, No.7.4H2x 7.2L1, No.7.9H2x7.12L2, No.7.9H4x7.12L2, No.7.11H1x7.11L1, No.7.11H1x7.2L1 e No.7.9H7 ou SEQ ID NOs: 294 a 413 para anticorpos/moléculas de anticorpo MSR-R MS-R No.3.3H1x3.4L9, No.3.4H1x3.4L9, No.3.4H3x 3.4L7, No.3.4H3x3.4L9, No.3.4H7x3.4L9,

No.3.4H7x3.4L7, No.3.6H5x 3.6L1, No.7.2H2x7.2L1, No.7.4H2x7.12L2, No.7.9H2x7.2L1, No.7.9H2x7.12L1, No.7.11 H2x7.2L1, No.7.11 H2x7.9L1, No.7.11 H2x7.12L1 ou No.8.1H1x8.2L1. Desse modo, além das regiões V_H- definidas acima, as moléculas de anticorpo preferidas da invenção podem compreender regiões V_H- conforme definido em qualquer uma das SEQ ID NOs: 294 a 323. Similarmente, as SEQ ID NOs: 324 a 353 mostram as regiões V_L- preferidas que, além das regiões V_L- definidas acima, podem ser compreendidas nas moléculas de anticorpo da invenção. Regiões CDR-3 correspondentes são definidas acima, bem como em sequências adicionais mostradas nas SEQ ID NOs: 354 a 413.

[0042] As moléculas de anticorpo da invenção podem ser facilmente produzidas em quantidades suficientes, *inter alia*, através de métodos recombinantes conhecidos na técnica, vide, por exemplo, Bentley, *Hybridoma* 17 (1998), 559-567; Racher, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40 (1994), 851-856; Samuelsson, *Eur. J. Immunol.* 26 (1996), 3029-3034.

[0043] Teoricamente, em β -A4 solúvel (monomérico/oligomérico) ambos epitopos N-terminal e médio são acessíveis para interação de anticorpo e moléculas de anticorpo da presente invenção podem se ligar ou ao epitopo N-terminal ou médio separadamente, mas sob essas condições afinidade máxima não será obtida. No entanto, é mais provável que um contato ótimo com o paratopo do anticorpo seja conseguido através de ligação simultânea a ambos epitopos, isto é, similar à interação com β -A4 agregado. Desse modo, anticorpos da presente invenção são anticorpos anti-A β únicos pelo fato de que eles se ligam a β -A4 agregado (através da interação com epitopo N-terminal e médio) e ao mesmo tempo são também capazes de estabilizar e neutralizar o epitopo conformacional em β -A4 solúvel. Esses anticorpos são diferentes dos anticorpos da técnica anterior.

[0044] Mais preferidas são moléculas de anticorpo da invenção que têm uma afinidade com A β ou seus fragmentos definidos com um valor K_D menor do que 2000 nM, de preferência menor do que 100 nM, com mais preferência menor do que 10 nM, com mais preferência menor do que 1 nM. A medição de tal afinidade/afinidades pode ser realizada através de métodos ilustrados nos exemplos e conhecidos na técnica. Tais métodos compreendem, mas não estão limitados a, ensaios BIACORE® (www.biacore.com; Malmquist (1999), *Biochem. Soc. Trans.* 27, 335-340) e ensaios de fase sólida usando anticorpos marcados ou A β marcado.

[0045] De preferência, a molécula de anticorpo da invenção é capaz de decorar/reagir com/se ligar a placas amiloide em seções cerebrais *in vitro* (pós-morte) de pacientes sofrendo de distúrbios relacionados à amiloide, tal como doença de Alzheimer. Ainda, é também preferido que o anticorpo/moléculas de anticorpo da invenção previnam a agregação de A β em ensaios *in vivo* bem como *in vitro*, conforme ilustrado nos exemplos anexos. Similarmente, as moléculas de anticorpo da presente invenção são preferidas para despolimerizar agregado de A β em ensaios *in vivo* e/ou *in vitro* mostrados nos exemplos. Esta capacidade dos anticorpos/moléculas de anticorpo da invenção deve, *inter alia*, ser empregada em ambientes médicos, em particular em composições farmacêuticas descritas abaixo.

[0046] A invenção também provê uma molécula de ácido nucléico codificando uma molécula de anticorpo da invenção conforme aqui definido.

[0047] A dita molécula de ácido nucléico pode ser uma molécula de ácido nucléico natural bem como uma molécula de ácido nucléico recombinante. A molécula de ácido nucléico da invenção pode, desse modo, ser de origem natural, sintética ou semi-sintética. Ela pode compreender DNA, RNA bem como PNA e ela pode ser um híbrido

dela.

[0048] É evidente para a pessoa versada na técnica que sequências reguladoras podem ser adicionadas à molécula de ácido nucléico da invenção. Por exemplo, promotores, realçadores transcripcionais e/ou sequências que permitem a expressão induzida do polinucleotídeo da invenção podem ser empregados. Um sistema indutor adequado é, por exemplo, expressão do gene regulada por tetraciclina conforme descrito, por exemplo, por Gossen e Bujard (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (1992), 5547-5551) e Gossen e outros (*Trends Biotech.* 12 (1994), 58-62), ou um sistema de expressão de gene induzível por dexametasona conforme descrito, por exemplo, por Crook (1989) *EMBO J.* 8, 513-519.

[0049] Ainda, é imaginado para propósitos adicionais que a molécula de ácido nucléico possa conter, por exemplo, ligações tioéster e/ou análogos de nucleotídeo. As ditas modificações podem ser úteis para a estabilização da molécula de ácido nucléico contra endo- e/ou exonuclease na célula. As ditas moléculas de ácido nucléico podem ser transcritas por um vetor apropriado contendo um gene quimérico que permite a transcrição da dita molécula de ácido nucléico na célula. Com relação a isso, deve ser também compreendido que o polinucleotídeo da invenção pode ser usado para abordagens de "marcação de gene" ou "terapêuticas de gene". Em uma outra modalidade, as ditas moléculas de ácido nucléico são marcadas. Métodos para detecção de ácido nucléico são bem conhecidas na técnica, por exemplo, Southern e Northern blotting, PCR ou extensão de iniciador. Esta modalidade pode ser útil para métodos de avaliação para verificação de introdução bem sucedida das moléculas de ácido nucléico da invenção durante abordagens de terapia gênica.

[0050] A(s) molécula(s) de ácido nucléico da invenção podem ser

uma molécula de ácido nucléico quimérica recombinantemente produzida compreendendo qualquer uma das moléculas de ácido nucléico acima mencionadas ou sozinha ou em combinação. De preferência, a molécula de ácido nucléico da invenção é parte de um vetor.

[0051] A presente invenção desse modo refere-se também a um vetor compreendendo a molécula de ácido nucléico da presente invenção. O vetor da presente invenção pode ser, por exemplo, um plasmídeo, cosmídeo, vírus, bacteriófago ou um outro vetor usado, por exemplo, convencionalmente em engenharia genética, e pode compreender genes adicionais tais como genes marcadores que permitem a seleção do dito vetor em uma célula do hospedeiro adequada e sob condições adequadas. Ainda, o vetor da presente invenção pode, em adição às sequências de ácido nucléico da invenção, compreender elementos de controle de expressão, permitindo a expressão apropriada das regiões de codificação em hospedeiros adequados. Tais elementos de controle são conhecidos do versado na técnica e podem incluir um promotor, um cassete de união, códon de iniciação de tradução, local de tradução e inserção para introdução de uma inserção no vetor. De preferência, a molécula de ácido nucléico da invenção está operativamente ligada às ditas sequências de controle de expressão permitindo a expressão em células eucarióticas ou procarióticas.

[0052] Elementos de controle que asseguram a expressão em células eucarióticas e procarióticas são bem conhecidos daqueles versados na técnica. Conforme acima mencionado, eles geralmente compreendem sequências de regulagem que asseguram o início de transcrição e opcionalmente sinais poli-A que asseguram o término da transcrição e estabilização do transcrito. Elementos de regulagem adicionais podem incluir realçadores transcripcionais bem como de

tradução, e/ou regiões de promotor naturalmente associadas ou heterólogas. Elementos reguladores possíveis que permitem a expressão em, por exemplo, células do hospedeiro de mamífero, compreendem o promotor de timidina cinase CMV-HSV, SV40, promotor RSV (Vírus Rous Sarcoma), promotor 1α de fator de alongamento humano, o promotor MMTV induzível por glucocorticóide (Vírus de Tumor de Camundongo Moloney), promotores induzíveis por metalotioneína ou tetraciclina, ou realçadores, tais como realçador CMV ou realçador SV40. Para expressão em células neurais, é imaginado que os promotores de neurofilamento, PGDF, NSE, PrP ou thy-1 possam ser empregados. Os ditos promotores são conhecidos na técnica e, *inter alia*, descritos em Charron (1995), *J. Biol. Chem.* 270, 25739-25745. Para expressão em células procarióticas, uma variedade de promotores incluindo, por exemplo, o promotor tac-lac ou o promotor trp, foi descrita. Além dos elementos que são responsáveis pelo início da transcrição tais elementos de regulação podem também compreender sinais de terminação de transcrição, tais como local de SV40-poli-A ou o local tk-poli-A, a jusante do polinucleotídeo. Neste contexto, vetores de expressão adequados são conhecidos na técnica tais como vetor de expressão de cDNA Okayama-Bertg pcDV1 (Pharmacia), pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (In-vitrogene), pSPORT1 (GIBCO BRL), pX (Pagano (1992) *Science* 255, 1144-1147), vetores de dois híbridos de levedura, tal como pEG202 e dpJG4-5 (Gyuris (1995) *Cell* 75, 791-803), ou vetores de expressão procarióticos, tais como lâmbda gt11 ou pGEX (Amersham-Pharmacia). Além das moléculas de ácido nucléico da presente invenção, o vetor pode compreender ainda sequências de ácido nucléico codificando sinais de secreção. Tais sequências são bem conhecidas da pessoa versada na técnica. Ainda, dependendo do sistema de expressão usado, sequências líder capazes de direcionar os peptídeos da invenção para

um compartimento celular podem ser adicionadas à sequência de codificação das moléculas de ácido nucléico da invenção e são bem conhecidas na técnica. A(s) sequência(s) líder é (são) montadas em fase apropriada com sequências de tradução, iniciação e terminação, e, de preferência, uma sequência líder capaz de direcionar a secreção de proteína traduzida, ou uma proteína dela, no espaço periplásmico ou meio extracelular. Opcionalmente, a sequência heteróloga pode codificar uma proteína de fusão incluindo um peptídeo de identificação C- ou N-terminal dando características desejadas, por exemplo, estabilização ou purificação simplificada de produto recombinante expresso. Uma vez o vetor incorporado ao hospedeiro apropriado, o hospedeiro é mantido sob condições adequadas para expressão de alto nível das sequências de nucleotídeo, e, conforme desejado, a coleta e purificação das moléculas de anticorpo ou seus fragmentos da invenção podem seguir. A invenção refere-se também, desse modo, a hospedeiros/células do hospedeiro que compreendem um vetor conforme aqui definido. Tais hospedeiros podem ser úteis em processos para obtenção de anticorpos/moléculas de anticorpo da invenção bem como em ambiente médicos/farmacêuticos. As ditas células do hospedeiro podem também compreender células neuronais transduzidas ou transfectadas, tais como células tronco neuronais, de preferência células tronco neuronais adultas. Tais células do hospedeiro podem ser úteis em terapias de transplante.

[0053] Ainda, o vetor da presente invenção pode também ser um vetor de expressão, de transferência de gene e de marcação de gene. Terapia gênica, que é baseada na introdução de genes terapêuticos nas células através de técnicas *ex-vivo* ou *in-vivo*, é uma das aplicações mais importantes de transferência de gene. Camundongos transgênicos expressando um anticorpo de neutralização direcionado contra fator de crescimento de nervo foram gerados usando a técnica

de "neuroanticorpo"; Capsoni, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97 (2000), 6826-6831 e Biocca, *Embo J.* 9 (1990), 101-108. Vetores, métodos ou sistemas de aplicação de gene adequados para terapia gênica *in-vitro* ou *in-vivo* são descritos na literatura e são conhecidos da pessoa versada na técnica; vide, por exemplo, Giordano, *Nature Medicine* 2 (1996); 534-539; Schaper, *Circ. Res.* 79 (1996), 911-919; Anderson, *Science* 256 (1992), 808-813, Isner, *Lancet* 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, *Circ. Res.* 77 (1995), 1077-1086; Onodua, *Blood* 91 (1998), 30-36; Verzeletti, *Hum. Gene Ther.* 9 (1998), 2243-2251; Verma, *Nature* 389 (1997), 239-242; Anderson, *Nature* 392 (Supp. 1998), 25-30; Wang, *Gene Therapy* 4 (1997), 393-400; Wang, *Nature Medicine* 2 (1996), 714-716; WO 94/29469; WO 97/00957; US 5.580.859; US 5.589.466; US 4.394.448 ou Schaper, *Current Opinion in Biotechnology* 7 (1996), 635-640, e referências citadas neles. Em particular, os ditos vetores e/ou sistemas de aplicação de gene são também descritos em abordagens de terapia gênica em tecido/células neurológicas (vide, *inter alia*, Blömer, *J. Virology* 71 (1997) 6641-6649) ou no hipotálamo (vide, *inter alia*, Geddes, *Front Neuroendocrinol.* 20 (1999), 296-316 ou Geddes, *Nat. Med.* 3 (1997), 1402-1404). Construções de terapia gênica adequados adicionais para uso em células/tecidos neurológicos são conhecidos na técnica, por exemplo, em Meier (1999), *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 1099-1110. As moléculas de ácido nucléico e vetores da invenção podem ser designados para introdução direta ou para introdução através de lipossomas, vetores virais (por exemplo, adenoviral, retroviral), eletroporação, balística (por exemplo, pistola de gene) ou outros sistemas de aplicação na célula. Adicionalmente, um sistema de baculovírus pode ser usado como sistema de expressão eucariótico para as moléculas de ácido nucléico da invenção. A introdução e abordagem terapêutica de gene devem, de preferência, levar à

expressão de uma molécula de anticorpo funcional da invenção, com o que a dita molécula de anticorpo expressão é particularmente útil no tratamento, alívio e/ou prevenção de distúrbios neurológicos relacionados à síntese, ajuntamento e/ou agregação de amiloide anormal, tal como doença de Alzheimer e similar.

[0054] Desse modo, a molécula de ácido nucléico da presente invenção e/ou os vetores/hospedeiros descritos acima da presente invenção podem ser particularmente úteis como composições farmacêuticas. As ditas composições farmacêuticas podem ser empregadas em abordagens de terapia gênica. Neste contexto, é imaginado que as moléculas de ácido nucléico e/ou vetores da presente invenção possam ser empregados para modular, alterar e/ou modificar a expressão e/ou concentração (celular) das moléculas de anticorpo da invenção ou de (um) fragmento(s) delas.

[0055] Para aplicações de terapia gênica, os ácidos nucléico codificando o(s) peptídeos(s) da invenção ou seus fragmentos podem ser clonados em um sistema de aplicação de gene, tal como um vírus e o vírus usado para infecção e conferir melhora da doença ou cura dos efeitos nas células ou organismo infectado.

[0056] A presente invenção refere-se também a uma célula do hospedeiro transfectada ou transformada com o vetor da invenção ou um hospedeiro não-humano carregando o vetor da presente invenção, isto é, a uma célula do hospedeiro ou hospedeiro que é geneticamente modificado com uma molécula de ácido nucléico de acordo com a invenção ou com um vetor compreendendo tal molécula de ácido nucléico. O termo "geneticamente modificado" significa que a célula do hospedeiro ou hospedeiro compreende em adição a seu genoma natural uma molécula de ácido nucléico ou vetor de acordo com a invenção que foi introduzido na célula ou hospedeiro ou em um de seus predecessores/origem. A molécula de ácido nucléico ou vetor

pode estar presente na célula do hospedeiro geneticamente modificada ou hospedeiro ou como uma molécula independente fora do genoma, de preferência como uma molécula que é capaz de replicação, ou ela pode ser estavelmente integrada no genoma da célula do hospedeiro ou hospedeiro.

[0057] A célula do hospedeiro da presente invenção pode ser qualquer célula procariótica ou eucariótica. As células procarióticas adequadas são aquelas geralmente usadas para clonagem tal como *E. coli* ou *Bacillus subtilis*. Ainda, as células eucarióticas compreendem, por exemplo, células fúngicas ou de animais. Exemplos de células fúngicas adequadas são células de levedura, de preferência aquelas do gênero *Saccharomyces* e com mais preferência aquelas da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. As células animais adequadas são, por exemplo, células de inseto, células de vertebrado, de preferência células de mamífero, tais como, por exemplo, HEK293, NSO, CHO, MDCK, US-OSHela, NIH3T3, MOLT-4, Jurkat, PC-12, PC-3, IMR, NT2N, Sk-n-sh, CaSki, C33A. Essas células do hospedeiro, por exemplo, células CHO, podem prover modificações pós-traducionais para as moléculas de anticorpo da invenção, incluindo remoção de peptídeo líder, duplicação e montagem de cadeias H (pesadas) e L (leves), glicosilação da molécula nos lados corretos e secreção da molécula funcional. Linhagens celulares adequadas adicionais conhecidos na técnica podem ser obtidos de depósitos de linhagens de célula, tal como o American Type Culture Collection (ATCC). De acordo com a presente invenção, é ainda imaginado que células/culturas de célula primárias podem funcionar como células do hospedeiro. As ditas células são em particular derivadas de insetos (tais como insetos da espécie *Drosophila* ou *Blatta*) ou mamíferos (tais como ser humano, porco, camundongo ou rato). As ditas células do hospedeiro podem também compreender células de/ou derivadas de

tipos celulares tal como linhagens de célula neuroblastoma. As células primárias mencionadas acima são bem conhecidas na técnica e compreendem, *inter alia*, astrócitos primários, culturas espinhais (mistas) ou culturas hipocampais.

[0058] Em uma modalidade mais preferida, a célula do hospedeiro que é transformada com o vetor da invenção é uma célula neuronal, uma célula tronco neuronal (por exemplo, uma célula tronco neuronal adulta), uma célula cerebral ou uma célula (linhagem) derivada dela. No entanto, também uma célula CHO compreendendo a molécula de ácido nucléico da presente invenção pode ser particularmente útil como hospedeiro. Tais células podem prover modificações secundárias corretas nas moléculas expressas, isto é, as moléculas de anticorpo da presente invenção. Essas modificações compreendem, *inter alia*, glicosilações e fosforilações.

[0059] Os hospedeiros podem ser mamíferos não-humanos, com mais preferência camundongos, ratos, ovelhas, bezerros, cachorros, macacos ou chimpanzés. Os ditos mamíferos podem ser indispensáveis para desenvolvimento de uma cura, de preferência uma cura para distúrbios neurológicos e/ou neurodegenerativos mencionados aqui. Ainda, os hospedeiros da presente invenção podem ser particularmente úteis na produção das moléculas de anticorpo (ou seus fragmentos) da invenção. É imaginado que as ditas moléculas de anticorpo (ou seus fragmentos) sejam isoladas do dito hospedeiro. É, *inter alia*, imaginado que as moléculas de ácido nucléico e/ou vetores descritos aqui sejam incorporados em sequências para expressão transgênica. A introdução das moléculas de ácido nucléico da invenção como transgenes em hospedeiros não-humanos e sua subsequente expressão podem ser empregadas para a produção dos anticorpos da invenção. Por exemplo, a expressão de tal(is) transgene(s) no leite do animal transgênico provê meios de

obtenção das moléculas de anticorpo da invenção em quantidades quantitativas; vide, *inter alia*, U.S. 5.741.957, U.S. 5.304.489 ou U.S. 5.849.992. Transgenes úteis com relação a isso compreendem as moléculas de ácido nucléico da invenção, por exemplo, sequências de codificação para as cadeias leve e pesada das moléculas de anticorpo descritas aqui, operativamente ligadas a estruturas de promoção e/ou realce de um gene específico de glândula de mamífero, tal como caseína ou beta-lactoglobulina.

[0060] A invenção também provê um método para a preparação de uma molécula de anticorpo da invenção compreendendo cultura da célula do hospedeiro descrita acima sob condições que permitem a síntese da dita molécula de anticorpo e recuperação da dita molécula de anticorpo a partir da dita cultura.

[0061] A invenção também refere-se a uma composição compreendendo uma molécula de anticorpo da invenção ou produzida através do método descrito acima, uma molécula de ácido nucléico codificando a molécula de anticorpo da invenção, um vetor compreendendo a dita molécula de ácido nucléico ou uma célula do hospedeiro conforme definido aqui e, opcionalmente, mais moléculas, ou sozinhas ou em combinação, por exemplo, moléculas que são capazes de interferir com a formação de placas amiloide ou que são capazes de despolimerizar as placas amiloide já formadas. O termo "composição" conforme empregado aqui compreende pelo menos um composto da invenção. De preferência, tal composição é uma composição farmacêutica ou de diagnóstico.

[0062] A composição pode estar na forma sólida ou líquida e pode estar, *inter alia*, em uma forma de (um) pó(s), (um) comprimido(s), (uma) solução(ões) ou (um) aerossol(óis). A dita composição pode compreender um ou mais anticorpos/moléculas de anticorpo da invenção ou moléculas de ácido nucléico, vetor ou hospedeiro da

invenção. É também imaginado que a dita composição compreenda pelo menos dois, de preferência três, com mais preferência quatro, com mais preferência cinco moléculas de anticorpo da invenção ou molécula(s) de ácido nucléico codificando a(s) dita(s) molécula(s) de anticorpo. A dita composição pode também compreender anticorpos/moléculas de anticorpo da invenção, otimizadas, que podem ser obtidas através dos métodos descritos abaixo e nos exemplos anexos.

[0063] É preferido que a dita composição farmacêutica opcionalmente compreenda um veículo e/ou diluente farmacêuticamente aceitável. A composição farmacêutica descrita aqui pode ser particularmente útil para o tratamento de distúrbios neurológicos e/ou neurodegenerativos. Os ditos distúrbios compreendem, mas não estão limitados a, doença de Alzheimer, esclerose amiotrófica lateral (ALS), hemorragia cerebral hereditária com amiloidose do tipo Holandesa, síndrome de Down, demência relacionada ao HIV, doença de Parkinson e distúrbios neuronais relacionados ao envelhecimento. A composição farmacêutica da invenção é, *inter alia*, imaginada como inibidor potente de formação de placa amiloide ou como um estimulador potente para a despolimerização de placas amiloide. Desse modo, a presente invenção provê composições farmacêuticas compreendendo os compostos da invenção a serem usadas para o tratamento de doenças/distúrbios associados com proteólise de APP patológica e/ou formação de placa amiloide.

[0064] Exemplos de veículos, excipientes e/ou diluentes farmacêuticos adequados são bem conhecidos na técnica e incluem soluções salinas tamponadas com fosfato, água, emulsões, tais como emulsões óleo/água, vários tipos de agentes umectantes, soluções estéreis, etc. As composições compreendendo tais veículos podem ser

formuladas através de métodos convencionais bem conhecidos. Essas composições farmacêuticas podem ser administradas ao indivíduo em uma dose adequada. Administração das composições adequadas pode ser realizada através de maneiras diferentes, por exemplo, através de administração intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, intramuscular, tópica, intradérmica, intranasal ou intrabronquial. É particularmente preferido que a dita administração seja realizada através de injeção e/ou aplicação, por exemplo, a um local em uma artéria cerebral ou diretamente no tecido cerebral. As composições da invenção podem ser também administradas diretamente ao local alvo, por exemplo, através de aplicação biolística a um local alvo externo ou interno, tal como o cérebro. O regime de dosagem será determinado pelo médico atendente e fatores clínicos. Como é bem sabido na técnica médica, dosagens para qualquer paciente dependem de muitos fatores, incluindo o tamanho do paciente, área de superfície do corpo, idade, o composto particular a ser administrado, sexo, tempo e via de administração, saúde geral, e outras drogas sendo administradas concomitantemente. Matéria farmacologicamente ativa proteínica pode estar presente em quantidades entre 1 ng e 10 mg/kg de peso do corpo por dose; no entanto, doses abaixo ou acima desta faixa exemplar são imaginadas, especialmente considerando os fatores acima mencionados. Se o regime for uma infusão contínua, ela deve estar também na faixa de unidades de 1 µg a 10 mg por quilograma de peso do corpo por minuto. O progresso pode ser monitorado através de avaliação periódica. As composições da invenção podem ser administradas localmente ou sistemicamente. Deve ser observado que os anticorpos periféricamente administrados podem entrar no sistema nervoso central, vide, *inter alia*, Bard (2000), *Nature Med.* 6, 916-919. Preparações para administração parenteral incluem soluções, suspensões e emulsões aquosas ou não-aquosas

estéreis. Exemplos de solventes não-aquosos são propileno glicol, polietileno glicol, óleos vegetais tais como óleo de oliva, e ésteres orgânicos injetáveis tais como oleato de etila. Veículos aquosos incluem água, soluções alcoólicas/aquosas, emulsões ou suspensões, incluindo meio de solução salina e tamponado. Os veículos parentais incluem solução de cloreto de sódio, dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio, Ringer lactado ou óleos fixos. Os veículos intravenosos incluem reabastecedores de fluido e nutriente, reabastecedores de eletrólito (tais como aqueles baseados em dextrose de Ringer), e similar. Conservantes e outros aditivos podem também estar presentes tais como, por exemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes e gases inertes e similar. Ainda, a composição farmacêutica da invenção pode compreender ainda agentes dependendo do uso pretendido da composição farmacêutica. Os ditos agentes podem ser drogas que agem no sistema nervoso central, tais como fatores neuroprotetores, inibidores de colinesterase, agonistas de receptor muscarínico M1, hormônios, antioxidantes, inibidores de inflamação, etc. É particularmente preferido que a dita composição farmacêutica compreenda agentes adicionais tais como, por exemplo, neurotransmissores e/ou moléculas de substituição para neurotransmissores, vitamina E ou ácido alfa-lipóico.

[0065] As composições farmacêuticas, bem como os métodos da invenção ou os usos da invenção descrita infra podem ser usados para o tratamento de todos os tipos de doenças até agora desconhecidas ou estando relacionadas a ou dependentes de agregação de APP patológica ou processamento de APP patológica. Elas podem ser particularmente úteis para o tratamento de doença de Alzheimer e outras doenças onde depósitos extracelulares de β amiloide parecem desempenhar um papel. Elas podem ser desejavelmente empregadas em seres humanos, embora tratamento animal seja também

compreendido pelos métodos, usos e composições descritos aqui.

[0066] Em uma modalidade preferida da invenção, a composição da presente invenção conforme acima descrito é uma composição de diagnóstico compreendendo ainda, opcionalmente, meios adequados para detecção. A composição de diagnóstico compreende pelo menos um dos compostos da invenção acima mencionados. A dita composição de diagnóstico pode compreender os compostos da invenção, em particular e de preferência as moléculas de anticorpo da presente invenção, na forma solúvel/fase líquida mas também é imaginado que os ditos compostos sejam ligados a/anexados a/ou unidos a um apoio sólido.

[0067] Os apoios sólidos podem ser usados em combinação com a composição de diagnóstico conforme aqui definido ou os compostos da presente invenção podem ser diretamente ligados aos ditos apoios sólidos. Tais apoios são bem conhecidos na técnica e compreendem, *inter alia*, materiais de coluna comercialmente disponíveis, contas de poliestireno, contas de látex, contas magnéticas, partículas de metal colóide, lascas e superfícies de vidro e/ou silício, faixas de nitrocelulose, membranas, folhas, durácitos, cavidades e paredes de bandejas de reação, tubos plásticos, etc. O(s) composto(s) da invenção, em particular os anticorpos da presente invenção, podem ser ligados a muitos veículos diferentes. Exemplos de veículos bem conhecidos incluem vidro, poliestireno, cloreto de polivinila, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, náilon, amiloses, celulosas naturais e modificadas, poliacrilamidas, agaroses e magnetita. A natureza do veículo pode ser ou solúvel ou insolúvel para os propósitos da invenção. Os marcadores e métodos apropriados para marcação foram identificados acima e são ainda mencionados abaixo. Os métodos adequados para fixação/imobilização do(s) dito(s) composto(s) da invenção são bem conhecidos e incluem, mas não

estão limitados a, interações iônicas, hidrofóbicas, covalentes e similar.

[0068] É particularmente preferido que a composição de diagnóstico da invenção seja empregada para a detecção e/ou quantificação de APP e/ou produtos de processamento de APP, tal como β -amiloide ou para a detecção e/ou quantificação de lados de clivagem de APP patológica e/ou (geneticamente) modificada.

[0069] Conforme ilustrado nos exemplos anexos, os compostos da presente invenção, em particular as moléculas de anticorpo da invenção, são particularmente úteis como reagentes de diagnóstico na detecção de placas amiloide humanas genuínas em seções cerebrais de pacientes com Doença de Alzheimer através de imunofluorescência indireta.

[0070] É preferido que os ditos compostos da presente invenção a serem empregados em uma composição de diagnóstico sejam detectavelmente marcados. Uma variedade de técnicas está disponível para marcação de biomoléculas, são bem conhecidas do versado na técnica e são consideradas estar dentro do escopo da presente invenção. Tais técnicas são, por exemplo, descritas em Tijssen, "Practice and theory of enzyme immuno assays", Burden, RH e Von Knippenburg (Eds.), Volume 15 (1985), "Basic Methods in molecular biology"; Davis L.G., Dimer M.D.; Battey Elsevier (1990), Mayer e outros, (Eds.) "Immunochemical methods in cell and molecular biology", Academic Press, Londres (1987) ou na série "Methods in Enzymology", Academic Press, Inc.

[0071] Existem muitos marcadores e métodos de marcação diferentes conhecidos daqueles versados comum na técnica. Exemplos dos tipos de marcadores que podem ser usados na presente invenção incluem enzimas, radioisótopos, metais coloidais, compostos fluorescentes, compostos quimioluminescentes e

compostos bioluminescentes.

[0072] Os marcadores geralmente usados compreendem, *inter alia*, fluorcromos (tal como fluoresceína, rodamina, Vermelho Texas, etc), enzimas (tal como peroxidase de rábano silvestre, β -galactosidase, fosfatase alcalina), isótopos radioativos (tal como ^{32}P ou ^{125}I), biotina, digoxigenina, metais coloidais, compostos quimio- ou bioluminescentes (tal como dioxetanos, luminol ou acridínios). Procedimentos de marcação, tal como acoplamento covalente de enzimas ou grupos biotinila, iodinações, fosforilações, biotinilações, etc, são bem conhecidos na técnica.

[0073] Métodos de detecção compreendem, mas não estão limitados a, auto-radiografia, microscopia de fluorescência, reações enzimáticas diretas e indiretas, etc. Os ensaios de detecção geralmente usados compreendem métodos radioisotópicos e não-radioisotópicos. Esses compreendem, *inter alia*, Westernblotting, ensaios de sobrecamada, RIA (Radioimunoensaio) e IRMA (Ensaio Radioimunométrico Imune), EIA (Imunoensaio Enzima), ELISA (Imunoensaio Sorvente Ligado à Enzima), FIA (Imunoensaio Fluorescente) e CLIA (Imunoensaio Quimioluminescente).

[0074] Ainda, a presente invenção provê o uso de uma molécula de anticorpo da invenção, ou uma molécula de anticorpo produzida através do método da invenção, de uma molécula de ácido nucléico, vetor da ou um hospedeiro da invenção para a preparação de uma composição farmacêutica ou de diagnóstico para a prevenção, tratamento e/ou diagnóstico de uma doença associada com amiloidogênese e/ou formação de placa amiloide. É ainda preferido que os compostos descritos aqui, em particular as moléculas de anticorpo da invenção, sejam empregados na prevenção e/ou tratamento de neuropatologias associadas com processamento de APP modificada ou anormal e/ou amiloidogênese. As moléculas de

anticorpo, por exemplo, no formato de imunoglobulinas (construídas), tal como anticorpos em uma estrutura principal de IgG, em particular em uma estrutura principal de IgG1, ou no formato de anticorpos quiméricos, anticorpos biespecíficos, Fvs (scFvs) de cadeia simples ou scFvs biespecíficos e similar, são empregadas na preparação da composição farmacêutica provida aqui. Ainda, as moléculas de anticorpo são também úteis em ambientes de diagnóstico conforme documentado nos exemplos anexos, uma vez que as moléculas de anticorpo da invenção especificamente interagem com/detectam A β 4 e/ou depósitos/placas amiloide.

[0075] Desse modo, um uso da invenção dos compostos da presente invenção é o uso para a preparação de uma composição farmacêutica para um distúrbio neurológico que precisa de melhora, por exemplo, através de desintegração de placas de β -amiloide, através de desobstrução de (placa) amiloide ou através de imunização passiva contra formação de placa de β -amiloide. Conforme ilustrado nos exemplos anexos, as moléculas de anticorpo da invenção são particularmente úteis na prevenção de agregação de A β e em despolimerização de agregados de amiloide já formados. Desse modo, os anticorpos da invenção devem ser empregados na redução de depósitos/placas amiloide patológicas, na desobstrução de placas/precursores de placa amiloide bem como em proteção neuronal. É em particular imaginado que as moléculas de anticorpo da invenção sejam empregadas na prevenção *in vivo* de placas amiloide bem como em desobstrução *in vivo* de placas/depósitos de amiloide preexistentes. Ainda, as moléculas de anticorpo da invenção podem ser empregadas em abordagens de imunização passiva contra A β 4. A desobstrução de depósitos de A β 4/A β 4 pode, *inter alia*, ser conseguida através de uso médico de anticorpos da presente invenção que compreendem uma parte Fc. A dita parte Fc de um anticorpo pode ser

particularmente útil em respostas imune mediadas por receptor Fc, por exemplo, a atração de macrófagos (células fagocíticas e/ou microglia) e/ou células auxiliares. Para a mediação de imunorrespostas relacionadas à parte Fc, a molécula de anticorpo da invenção está de preferência em uma estrutura principal de IgG1 (humana). Conforme aqui discutido, o indivíduo preferido a ser tratado com as moléculas de anticorpo da invenção, as moléculas de ácido nucléico codificando as mesmas ou partes delas, os vetores da invenção ou as células do hospedeiro da presente invenção é um indivíduo humano. Outras estruturas principais, tal como estruturas principais de IgG2a ou IgG2b para as moléculas de anticorpo da invenção, são também consideradas. Estruturas principais de imunoglobulina nos formatos IgG2a e IgG2b são particularmente consideradas em ambientes de camundongo, por exemplo, em usos científicos das moléculas de anticorpo da invenção, por exemplo, em testes em camundongos transgênicos expressando APP do tipo selvagem (humano) ou mutada, fragmentos de APP e/ou A β 4.

[0076] As doenças citadas acima associadas com amiloidogênese e/ou formação de placa amiloide compreendem, mas não estão limitadas a, demência, doença de Alzheimer, neuropatia motora, doença de Parkinson, ALS (esclerose lateral amiotrófica), distúrbio degenerativo contagioso do sistema nervoso central, demência relacionada ao HIV bem como doença de Creutzfeld-Jakob, hemorragia cerebral hereditária, com amiloidose do tipo Holandesa, síndrome de Down e distúrbios neuronais relacionados ao envelhecimento. As moléculas de anticorpo da invenção e as composições providas aqui podem ser também úteis no alívio e ou prevenção de processos inflamatórios com relação à ou amiloidogênese e/ou formação de placa amiloide.

[0077] Desse modo, a presente invenção também provê um

método para tratamento, prevenção e/ou retardo de distúrbio neurológico e/ou neurodegenerativo compreendendo a etapa de administração a um indivíduo sofrendo do dito distúrbio neurológico e/ou neurodegenerativo e/ou a um indivíduo suscetível ao dito distúrbio neurológico e/ou neurodegenerativo de uma quantidade eficaz de uma molécula de anticorpo da invenção, uma molécula de ácido nucléico da invenção e/ou uma composição conforme definido acima.

[0078] Em uma outra modalidade, a presente invenção provê um estojo compreendendo pelo menos uma molécula de anticorpo, pelo menos uma molécula de ácido nucléico, pelo menos um vetor ou pelo menos uma célula do hospedeiro da invenção. Vantajosamente, o estojo da presente invenção compreende ainda, opcionalmente, (um) tampão(ões), soluções de armazenamento e/ou reagentes restantes ou materiais requeridos para a condução de ensaios e propósitos médicos, científicos ou de diagnóstico. Ainda, partes do estojo da invenção podem ser embaladas individualmente em frascos ou garrafas ou em combinação em recipientes ou unidades multi-recipiente.

[0079] O estojo da presente invenção pode ser vantajosamente usado, *inter alia*, para realizar o método da invenção e poderia ser empregado em uma variedade de aplicações referidas aqui, por exemplo, como estojos de diagnóstico, como ferramentas de pesquisa ou ferramentas médicas. Adicionalmente, o estojo da invenção pode conter meios para detecção adequada para propósitos científico, médico e/ou de diagnóstico. A fabricação dos estojos segue de preferência procedimentos padrão que são conhecidos do versado na técnica.

[0080] A invenção também provê um método para a otimização de uma molécula de anticorpo conforme acima definido compreendendo

as etapas de:

(a) construção de uma biblioteca de fragmentos de anticorpo Fab diversificados derivados de um anticorpo compreendendo pelo menos uma CDR3 de uma região V_H conforme codificado por uma molécula de ácido nucléico conforme mostrado na SEQ ID NO: 21, 23 ou 25 ou pelo menos uma sequência de aminoácido de CDR3 de uma região V_H conforme mostrado na SEQ ID NO: 22, 24 ou 26;

(b) teste da biblioteca de otimização de Fab resultante através de "panning" contra A β /A β 4;

(c) identificação de clones otimizados; e

(d) expressão de clones selecionados, otimizados.

[0081] A otimização dos anticorpos/moléculas de anticorpo da invenção é também documentada nos exemplos anexos e pode compreender a seleção de, por exemplo, afinidade mais alta para uma ou ambas regiões/epitopos de β -A4 conforme aqui definido ou seleção de expressão aperfeiçoada e similar. Em uma modalidade, a dita seleção de afinidade mais alta para um ou ambos regiões/epitopos de β -A4 compreende a seleção de alta afinidade para (a) um prolongamento de aminoácido compreendendo 2 a 10 aminoácidos (ou (a) parte(s) dele) ou β -A4 e/ou (b) um prolongamento de aminoácido compreendendo os aminoácidos 12 a 25 (ou (a) parte(s) dele de β -A4 (SEQ ID NO:27).

[0082] O versado na técnica pode imediatamente realizar o método da invenção empregando os ensinamentos da presente invenção. Protocolos de otimização para anticorpos são conhecidos na técnica. Esses protocolos de otimização compreendem, *inter alia*, mutagênese guiada de CDR conforme descrito e ilustrado aqui e descrito em Yang (1995), *J. Mol. Biol.* 25, 392-403; Schier (1996) *J. Mol. Biol.* 263, 551-567; Barbas (1996), *Trends Biotech.* 14, 230-34 ou

Wu (1998), *PNAS* 95, 6037-6042; Schier (1996), *Human Antibodies Hybridomas* 7, 97; Moore (1997) *J. Mol. Biol.* 272, 336. Técnicas de "panning" são também conhecidas na técnica, vide, por exemplo, Kay (1993), *Gene* 128, 59-65. Ainda, publicações tal como Borrebaeck (1995), "Antibody Engineering", Oxford University Press, 229-266; McCafferty (1996), "Antibody Engineering", Oxford University Press; Kay (1996), "A Laboratory Manual", Academic Press provêm protocolos de otimização que podem ser modificados de acordo com a presente invenção.

[0083] O método de otimização pode compreender ainda uma etapa (ca), com o que os clones otimizados são ainda mais otimizados por mutagênese de cassete, conforme ilustrado nos exemplos anexos.

[0084] O método para otimização de uma molécula de anticorpo descrita aqui é ainda mais ilustrado nos exemplos anexos como maturação de afinidade de anticorpos de origem/moléculas de anticorpo capazes de especificamente reconhecer duas regiões do beta -A4 peptídeo/Abeta4/A β /A β 4/ β A4. De preferência, o dito A β /A β 4 (também chamada β A4 no contexto da presente invenção) na etapa (b) do método descrito acima é A β /A β 4 agregado. O dito "panning" pode ser realizado (conforme descrito nos exemplos anexos) com estringência de ligação maior. A estringência pode ser aumentada, *inter alia*, através da redução da concentração de A β /A β 4 ou através da elevação da temperatura (ensaio). O teste da biblioteca otimizada através de "panning" é conhecido do versado na técnica e descrito em Kay (1993) loc. cit. De preferência, a identificação na etapa (c) é realizada classificando de acordo com os valores K_D .

[0085] Com mais preferência, a dita identificação na etapa (c) é realizada através da classificação koff. A classificação koff é conhecida do versado na técnica e descrita em Schier (1996), loc. cit.; Schier (1996), *J. Mol. Biol.* 255, 28-43 ou Duenas (1996), *Mol. Immunol.* 33,

279-286. Além disso, a classificação koff é ilustrada nos desenhos anexos. A constante de "off-rate" pode ser medida conforme descrito nos exemplos anexos.

[0086] Conforme acima mencionado, os clones identificados podem, para mais avaliação, ser expressos. A expressão pode ser realizada através de métodos conhecidos, *inter alia*, ilustrados nos exemplos anexos. A expressão pode, *inter alia*, levar a fragmentos Fab expressos, scFvs, imunoglobulinas biespecíficas, moléculas de anticorpo biespecíficas, proteínas de fusão Fab- e/ou Fv, ou anticorpos completos, tal como IgGs, em particular, IgG1.

[0087] Anticorpos otimizados, em particular Fabs otimizados ou IgGs otimizados, de preferência IgG1s, podem ser testados através de métodos conforme ilustrado nos exemplos anexos. Tais métodos compreendem, mas não estão limitados a, teste de afinidades de ligação, a determinação dos valores KD, análise "pepspot", ensaios ELISA, ensaios RIA, ensaios CLIA, estudos (imuno-) histológicos (por exemplo, tingimento de placas amiloide), ensaios de despolimerização ou fagocitose de β -A4 dependente de anticorpo.

[0088] Em uma modalidade adicional da presente invenção, é provido um método onde os anticorpos otimizados são gerados através de clonagem cruzada. Este método é também ilustrado nos exemplos anexos e compreende a etapa de combinar independentemente regiões de CDR otimizadas, combinando independentemente H-CDR2 e L-CDR2 otimizadas de clones maduros com H-CDR3, de preferência a mesma H-CDR3.

[0089] Em uma modalidade preferida, a invenção refere-se a um método para a preparação de uma composição farmacêutica compreendendo as etapas de:

(a) otimização de um anticorpo de acordo com o método descrito aqui e ilustrado nos exemplos anexos; e

(b) formulação do anticorpo/molécula de anticorpo otimizada com um veículo fisiologicamente aceitável, conforme descrito acima.

[0090] Desse modo, a invenção também provê uma composição farmacêutica preparada através do método descrito aqui e compreendendo ainda moléculas de anticorpo otimizadas capazes de especificamente reconhecer duas regiões da peptídeo beta-A4 /Abeta4/A β /A4 β / β A4, conforme descrito acima.

As sequências exemplificadas são mencionadas aqui:

SEQ ID NO: 1

AEFRHDSGY

[0091] Primeira região do peptídeo β -A4, "região N-terminal/epitopo"

SEQ ID NO: 2

VHHQKLVFFAEDVG

[0092] Segunda região do peptídeo β -A4, "região central/média /epitopo"

SEQ ID NO: 3

[0093] Região VH de MS-Roche No. 3 (sequência de ácido nucléico)

CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTGCAACCGG
GCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTT
AGCAGCTATGCGATGAGCTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGG
TCTCGAGTGGGTGAGCGCGATTAGCGGTAGCGGCGGCAGCACCT
ATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTTACCATTTACGTGATAA
TTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGA
AGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTCTTACTCATTATGCTCGT
TATTATCGTTATTTTGGTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACG
GTTAGCTCAGC (SEQ ID NO : 3)

SEQ ID NO: 4

[0094] Região VH de MS-Roche No. 3 (sequência de aminoácido)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL
EWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCARLTHYARYYRYFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO : 4)

SEQ ID NO: 5

[0095] Região VH de MS-Roche No. 7 (sequência de ácido nucléico)

CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTGAACCGG
GCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTT
AGCAGCTATGCGATGAGCTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGG
TCTCGAGTGGGTGAGCGCGATTAGCGGTAGCGGCGGCAGCACCT
ATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTACCATTTACGTGATAAT
TCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAA
GATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTAAGGGTAATACTCAT
AAGCCTTATGGTTATGTTTCGTTATTTTGATGTTTGGGGCCAAGGCA
CCCTGGTGACGGTTAGCTCAGC (SEQ ID NO: 5)

SEQ ID NO: 6

[0096] Região VH de MS-Roche No.7 (sequência de aminoácido)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL
EWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCARGKGNTHKPYGYVRYFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 6)

SEQ ID NO: 7

[0097] Região VH de MS-Roche No.8 (sequência ácido nucléico)
CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTGAACCGG
GCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTT
AGCAGCTATGCGATGAGCTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGG
TCTCGAGTGGGTGAGCGCGATTAGCGGTAGCGGCGGCAGCACCT
ATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGTTTACCATTTACGTGATAA
TTCGAAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGA
AGATACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTCTTCTTTCTCGTGGTTAT

AATGGTTATTATCATAAGTTTGTATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTG
GTGACGGTTAGCTC AGC (SEQ ID NO: 7)

SEQ ID NO: 8

[0098] Região VH de MS-Roche No.8 (sequência de aminoácido)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL
EWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCARLLSRGYNGYYHKFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 8)

SEQ ID NO: 9

[0099] Região VL de MS-Roche No.3 (sequência de ácido
nucléico)

GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGTCTCC
GGCGAACGTGCGACCCTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGAGCGTG
AGCAGCAGCTATCTGGCGTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAAGC
ACCGCGTCTATTAATTTATGGCGCGAGCAGCCGTGCAACTGGGGT
CCCGGCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTTACCCT
GACCATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTTGCGGTTTATTATTG
CCAGCAGGTTTATAATCCTCCTGTTACCTTTGGCCAGGGTACGAA
AGTTGA AATTAAACGTACG (SEQ ID NO: 9)

SEQ ID NO: 10

[00100] Região VL de MS-Roche No.3 (sequência de aminoácido)
DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL
LIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQVYN
PPVTFGQGTKVEIKRT (SEQ ID NO: 10)

SEQ ID NO: 11

[00101] Região VL de MS-Roche No.7 (sequência de ácido
nucléico)

GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGTCTCC
GGCGAACGTGCGACCCTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGAGCGTG
AGCAGCAGCTATCTGGCGTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAAGC
ACCGCGTCTATTAATTTATGGCGCGAGCAGCCGTGCAACTGGGGT

CCCGGCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTTACCCT
GACCATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTTGCGACTTATTATTG
CTTTCAGCTTTATTCTGATCCTTTTACCTTTGGCCAGGGTACGAAA
GTTGAAATTAACGTACG (SEQ ID NO. 11)

SEQ ID NO: 12

[00102] Região VL de MS-Roche No.7 (sequência de aminoácido)
DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL
LIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFATYYCFQLYSD
PFTFGQGTKVEIKRT (SEQ ID NO: 12)

SEQ ID NO: 13

[00103] Região VL de MS-Roche No.8 (sequência de ácido
nucléico)

GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGGCGACCCTGAGCCTGTCTCC
GGGCGAACGTGCGACCCTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGAGCGTG
AGCAGCAGCTATCTGGCGTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAAGC
ACCGCGTCTATTAATTTATGGCGCGAGCAGCCGTGCAACTGGGGT
CCCGGCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTTACCCT
GACCATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTTGCGACTTATTATTG
CCAGCAGCTTTCTTCTTTTCCTCCTACCTTTGGCCAGGGTACGAAA
GTTGA AATTAACGTACG (SEQ ID NO: 13)

SEQ ID NO: 14

[00104] Região VL de MS-Roche No.8 (sequência de aminoácido)
DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL
LIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFATYYCQQLSSF
PPTFGQGTKVEIKRT (SEQ ID NO : 14)

SEQ ID NO: 15

[00105] CDR3 da Região VL de MSR-3 (sequência de ácido
nucléico)

|CAGCAGGTTTATAATCCTCCTGTT|

(SEQ ID NO: 15)

SEQ ID NO: 16

[00106] CDR3 da Região V_L de MSR-3 (sequência de aminoácido)
QQVYNPPV (SEQ ID NO: 16)

SEQ ID NO: 17

[00107] CDR3 da Região V_L de MSR-7 (sequência de ácido
nucléico)

|TTTCAGCTTTATTCTGATCCTTTT|

(SEQ ID NO: 17)

SEQ ID NO: 18

[00108] CDR3 da Região V_L de MSR-7 (sequência de aminoácido)
FQLYSDPF (SEQ ID NO. 18)

SEQ ID NO: 19

[00109] CDR3 da Região V_L de MSR-8 (sequência de ácido
nucléico)

CAGCAGCTTTCTTCTTTTCCTCCT

(SEQ ID NO. 19)

SEQ ID NO: 20

[00110] CDR3 da Região V_L de MSR-8 (sequência de aminoácido)
QQLSSFPP (SEQ ID NO: 20)

SEQ ID NO: 21

[00111] CDR da Região V_H de MSR-3 (sequência de ácido
nucléico)

CTTACTCATTATGCTCGTTATTATCGTTATTTTGATGTT

(SEQ ID NO: 21)

SEQ ID NO: 22

[00112] CDR da Região V_H de MSR-3 (sequência de aminoácido)
LTHYARYYRYFDV

(SEQ ID NO: 22)

SEQ ID NO: 23

[00113] CDR da Região V_H de MSR-7 (sequência de ácido

nucléico)

GGTAAGGGTAATACTCATAAGCCTTATGGTTATGTTTCGTTATTTTG
ATGT

(SEQ ID NO: 23)

SEQ ID NO: 24

[00114] CDR da Região V_H de MSR-7 (sequência de aminoácido)
GKGNTHKPYGYVRYFDV (SEQ ID NO: 24)

SEQ ID NO: 25

[00115] CDR da Região V_H de MSR-8 (sequência de ácido
nucléico)

CTTCTTTCTCGTGGTTATAATGGTTATTATCATAAGTTTGATGTT
(SEQ ID NO. 25)

SEQ ID NO: 26

[00116] CDR da Região V_H de MSR-8 (sequência de aminoácido)
LLSRGYNGYYHKFDV (SEQ ID NO: 26)

SEQ ID NO: 27 Aβ4 (aminoácidos 1 a 42)

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
(SEQ ID NO: 27)

SEQ ID NO: 28 iniciador

5'-GTGGTGGTTCCGATATC-3' (SEQ ID NO: 28)

SEQ ID NO: 29 iniciador

5'-AGCGTCACACTCGGTGCGGCTTTCGGCTGGCCAAGAACGGTTA-3'
(SEQ ID NO: 29)

SEQ ID NO: 30 iniciador

5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' (SEQ ID NO: 30)

SEQ ID NO: 31 iniciador

5'-TACCGTTGCTCTTCACCCC-3' (SEQ ID NO: 31)

SEQ ID NO: 32 VH de MS-Roche No.3 .6H5 x 3.6L2; DNA; sequência
artificial

CAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCA

GCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCT
ATGCGATGAGCTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAG
TGGGTGAGCGCTATTTCTGAGTCTGGTAAGACTAAGTATTATGCT
GATTCTGTAAAGGGTCGTTTTACCATTTACGTGATAATTCGAAAA
ACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGG
CCGTGTATTATTGCGCGCGTCTTACTCATTATGCTCGTTATTATCG
TTATTTTATGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTTAGCTC
A (SEQ ID NO: 32)

SEQ ID NO. 33: região VH prot de MS-Roche No.3.6H5 x 3.6L2;
proteína/1; sequência artificial

QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW
VSAISESGKTKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCARLTHYARYYRYFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 33)

SEQ ID NO: 34 região de VH de MS-Roche No.3.6H8 x 3.6L2; DNA;
sequência artificial

CAATTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCG
GCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTAGC
AGCTATGCGATGAGCTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCT
CGAGTGGGTGAGCGCTATTTCTGAGTATTCTAAGTTTAAGTATTAT
GCTGATTCTGTAAAGGGTCGTTTTACCATTTACGTGATAATTCGA
AAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATA
CGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTCTTACTCATTATGCTCGTTATTA
TCGTTATTTTATGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACGGTT
AGCTCA (SEQ ID NO: 34)

SEQ ID NO: 35 região VH prot de MS-Roche No.3.6H8 x 3.6L2;
proteína/1; sequência artificial

QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW
VSAISEYSKFKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCARLTHYARYYRYFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 35)

SEQ ID NO: 36 região VH de MS-Roche No.7.4H2 x 7.2L 1; DNA;

sequência artificial

CAATTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCA
GCCTGCGTC'TGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTAGCAGC
TATGCGATGAGCTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGA
GTGGGTGAGCGCTATTAATTATAATGGTGCTCGTATTTATTATGCT
GATTCTGTAAAGGGTCGTTTTACCATTTACGTGATAATTCGAAAA
ACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACG
GCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTAAGGGTAATACTCATAAGCCT
TATGGTTATGTTTCGTTATTTTGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGG
TGACGGTTAGCTCA

(SEQ ID NO: 36)

SEQ ID NO: 37 região VH prot de MS-Roche No.7.4H2 x 7.2L1;
proteína/1; sequência artificial

QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW
VSAINYNGARIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCARGKGNTHKPYGYVRYFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 37)

SEQ ID NO: 38 região VH de MS-Roche No.7.9H2 x 7.12 L2; DNA;
sequência artificial

CAATTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCG
GCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTAGC
AGCTATGCGATGAGCTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCT
CGAGTGGGTGAGCGCTATTAATGCTGATGGTAATCGTAAGTATTA
TGCTGATTCTGTAAAGGGTCGTTTTACCATTTACGTGATAATTCG
AAAACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGAT
ACGGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTAAGGGTAATACTCATAAG
CCTTATGGTTATGTTTCGTTATTTTGATGTTTGGGGCCAAGGCACCC
TGGTGACGGTTAGCTCA (SEQ ID NO: 38)

SEQ ID NO: 39 região VH prot de MS-Roche No.7.9H2 x 7.12 L2;
proteína/1; sequência artificial

QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW

VSAINADGNRKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCARGKGNTHKPYGYVRYFDVWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 39)
SEQ ID NO: 40 região VH de MS-Roche No.7.9H4 x 7.12L2; DNA;
sequência artificial

CAATTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGC
AGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTAGCAG
CTATGCGATGAGCTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCG
AGTGGGTGAGCGCTATTAATGCTGTTGGTATGAAGAAGTTTTATG
CTGATTCTGTAAAGGGTCGTTTTACCATTTACGTGATAATTCGAA
AACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATAC
G GCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTAAGGGTAATACTCATAAGC
CTTATGGTTATGTTTCGTTATTTTGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCT
GGTGACGGTTAGCTCA

(SEQ ID NO: 40)

SEQ ID NO: 41 região VH prot de MS-Roche No.7.9H4 x 7.12L2;
proteína/1; sequência artificial

QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW
VSAINAVGMKKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCARGKGNTHKPYGYVRYFDVWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 41)

SEQ ID NO: 42 VH de MS-Roche No.7.11 H1 x 7.11L1; DNA;
sequência artificial

CAATTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGGCA
GCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCT
ATGCGATGAGCTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAG
TGGGTGAGCGGTATTAATGCTGCTGGTTTTTCGTA CT TATTATGCTG
ATTCTGTAAAGGGTCGTTTTACCATTTACGTGATAATTCGAAAA
CACCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGC
CGTGTATTATTGCGCGCGTGGTAAGGGTAATACTCATAAGCCTTAT
GGTTATGTTTCGTTATTTTGATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTGGTG
ACGGTTAGCTCA (SEQ ID NO: 42)

SEQ ID NO. 43 região VH prot de MS-Roche No.7.11 H1 x 7.11L1;
proteína/1; sequência artificial

QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW
VSGINAAGFRITYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCARGKGNTHKPYGYVRYFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 43)

SEQ ID NO: 44 região VH de MS-Roche No.7.11H1 x 7.2L1; DNA;
sequência artificial

CAATTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTGCAACCGGGCGG
CAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCCTCCGGATTTACCTTTAGCA
GCTATGCGATGAGCTGGGTGCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTC
GAGTGGGTGAGCGGTATTAATGCTGCTGGTTTTTCGTAATTATTATG
CTGATTCTGTAAAGGGTCGTTTTACCATTTACGTGATAATTCGAA
AACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATAC
GGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGTAAGGGTAATACTCATAAGCC
TTATGGTTATGTTTCGTTATTTTATGTTTGGGGCCAAGGCACCCTG
GTGACGGTTAGCTCA (SEQ ID NO: 44)

SEQ ID NO: 45 região VH prot de MS-Roche No.7.11 H1 x 7.2L1;
proteína/1; sequência artificial

QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW
VSGINAAGFRITYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCARGKGNTHKPYGYVRYFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 45)

SEQ ID NO: 46 região VL de MS-Roche No.3.6H5 x 3.6L2; DNA;
sequência artificial

GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGTCTCC
GGGC GAACGTGCGACCCTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGTTTCTTT
CTCGTTATTATCTGGCGTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAAGCAC
CGCGTCTATTAATTTATGGCGCGAGCAGCCGTGCAACTGGGGTCC
CGGCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTTACCCTGA
CCATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTTGCGGTTTATTATTGCCA
GCAGACTTATAATTATCCTCCTACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTT

GAAAT TAAACGTACG (SEQ ID NO: 46)

SEQ ID NO:47 região VL prot de MS-Roche No.3.6H5 x 3.6L2;
proteína/1; sequência artificial

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFLSRYYLAWYQQKPGQAPRL
LIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQTYNY
PPTFGQGTKVEIKRT (SEQ ID NO: 47)

SEQ ID NO: 48 região VL de MS-Roche No.3.6H8 x 3.6L2; DNA;
sequência artificial

GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGTCTCC
GGCGAACGTGCGACCCTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGTTTCTTT
CTCGTTATTATCTGGCGTGGTACCAGCAGAAftACCAGGTCAAGCAC
CGCGTCTATTAATTTATGGCGCGAGCAGCCGTGCAACTGGGGTCC
CGGCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTTACCCTGA
CCATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTTGCGGTTTATTATTGCCA
GCAGACTTATAATTATCCTCCTACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTT
GAAAT TAAACGTACG (SEQ ID NO: 48)

SEQ ID NO: 49 região VL prot de MS-Roche No.3.6H8 x 3.6L2;
proteína/1; sequência artificial

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFLSRYYLAWYQQKPGQAPRL
LIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQTYNY
PPTFGQGTKVEIKRT (SEQ ID NO: 49)

SEQ ID NO: 50 região VL de MS-Roche No.7.4H2 x 7.2L1; DNA;
sequência artificial

GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGTCTCC
GGCGAACGTGCGACCCTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGTATGTTG
ATCGTACTTATCTGGCGTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAAGCAC
CGCGTCTATTAATTTATGGCGCGAGCAGCCGTGCAACTGGGGTCC
CGGCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTTACCCTGA
CCATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTTGCGACTTATTATTGCCA
GCAGATTTATTCTTTTCCTCATACTTTGGCCAGGGTACGAAAGTT

GAAAT TAAACGTACG (SEQ ID NO: 50)

SEQ ID NO: 51 região VL prot de MS-Roche No.7.4H2 x 7.2L1; proteína/1; sequência artificial

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQYVDRTYLAWYQQKPGQAPRL
LIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYCQQIYSF
PHTFGQGTKVEIKRT (SEQ ID NO: 51)

SEQ ID NO: 52 região VL de MS-Roche No.7.9H2 x 7.12 L2; DNA; sequência artificial

GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGTCTCC
GGCGAACGTGCGACCCTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGCGTTTTT
TTTATAAGTATCTGGCGTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAAGCAC
CGCGTCTATTAATTTCTGGTTCTTCTAACCGTGCAACTGGGGTCCC
GGCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTTACCCTGAC
CATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTTGCGGTTTATTATTGCCTT
CAGCTTTATAATATTCCTAATACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTG
AAATTA AACGTACG (SEQ ID NO: 52)

SEQ ID NO: 53 região VL prot de MS-Roche No.7.9H2 x 7.12L2; proteína/1; sequência artificial

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQRFFYKYLAWYQQKPGQAPRL
LISGSSNRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCLQLYNI
PNTFGQGTKVEIKRT (SEQ ID NO: 53)

SEQ ID NO: 54 região VL de MS-Roche No.7.9H4 x 7.12L2; DNA; sequência artificial

GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGTCTCC
GGCGAACGTGCGACCCTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGCGTTTTT
TTTATAAGTATCTGGCGTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAAGCAC
CGCGTCTATTAATTTCTGGTTCTTCTAACCGTGCAACTGGGGTCCC
GGC9CGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTTACCCTGAC
CATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTTGCGGTTTATTATTGCCTT
CAGCTTTATAATATTCCTAATACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTG

AAATTA AACGTACG (SEQ ID NO: 54)

SEQ ID NO: 55 região VL prot de MS-Roche No.7.9H4 x 7.12L2;
proteína/1; sequência artificial

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQRFFYKYLAWYQQKPGQAPRL
LISGSSNRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCLQLYNI
PNTFGQGKVEIKRT (SEQ ID NO: 55)

SEQ ID NO: 56 região VL de MS-Roche No.7.11 H1 x 7.11 L1; DNA;
sequência artificial

GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGT
CTCCGGGCGAACGTGCGACCCTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGCG
TATTCTTCGTATTTATCTGGCGTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAA
GCACCGCGTCTATTAATTTATGGCGCGAGCAGCCGTGCAACTGG
GGTCCCGGCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTTA
CCCTGACCATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTTGCGACTTATT
ATTGCCAGCAGGTTTATTCTCCTCCTACACCTTTGGCCAGGGTAC
GAAAGTTGAAA TAAACGTACG (SEQ ID NO: 56)

SEQ ID NO: 57 região VL prot de MS-Roche No.7.11H1 x 7.11L1;
proteína/1; sequência artificial

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQRILRIYLAWYQQKPGQAPRLLI
YGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYCQQVYSP
HTFGQGKVEIKRT (SEQ ID NO: 57)

SEQ ID NO: 58 região VL de MS-Roche No.7.11H1 x 7.2L1; DNA;
sequência artificial

GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCGGCGACCCTGAGCCTGTCTCC
GGGCGAACGTGCGACCCTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGTATGTTG
ATCGTACTTATCTGGCGTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCAAGCAC
CGCGTCTATTAATTTATGGCGCGAGCAGCCGTGCAACTGGGGTCC
CGGCGCGTTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTTACCCTGA
CCATTAGCAGCCTGGAACCTGAAGACTTTGCGACTTATTATTGCCA
GCAGATTTATTCTTTTCCTACACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTT

GAAAT TAAACGTACG (SEQ ID NO: 58)

SEQ ID NO: 59 região VL prot de MS-Roche No.7.11H1 x 7.2L1;
proteína/1; sequência artificial

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQYVDRITYLAWYQQKPGQAPRL
LIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYCQQIYSF
PHTFGQGTKVEIKRT (SEQ ID NO: 59)

SEQ ID NO: 60 Região HCDR3 de MS-Roche No.3.6H5 x 3.6L2; DNA;
sequência artificial

CTTACTCATTATGCTCGTTATTATCGTTATTTTGATGTT (SEQ ID
NO: 60)

SEQ ID NO: 61 região HCDR3 prot de MS-Roche No.3.6H5 x 3.6L2;
proteína/1; sequência artificial

LTHYARYYRYFDV (SEQ ID NO: 61)

SEQ ID NO: 62 região HCDR3 de MS-Roche No.3.6H8 x 3.6L2; DNA;
sequência artificial

CTTACTCATTATGCTCGTTATTATCGTTATTTTGATGTT (SEQ ID
NO: 62)

SEQ ID NO: 63 região HCDR3 prot de MS-Roche No.3.6H8 x 3.6L2;
proteína/1; sequência artificial

LTHYARYYRYFDV (SEQ ID NO: 63)

SEQ ID NO: 64 região HCRD3 de MS-Roche No.7.4H2 x 7.2L1; DNA;
sequência artificial

GGTAAGGGTAATACTCATAAGCCTTATGGTTATGTTTCGTTATTTTG
ATGTT (SEQ ID NO: 64)

SEQ ID NO: 65 região HCDR3 prot de MS-Roche No.7.4H2 x 7.2L1;
proteína/1; sequência artificial

GKGNTHKPYGYVRYFDV (SEQ ID NO: 65)

SEQ ID NO: 66 região HCDR3 prot de MS-Roche No.7.9H2 x 7.12 L2;
DNA; sequência artificial

GGTAAGGGTAATACTCATAAGCCTTATGGTTATGTTTC

GTTATTTTGATGTT (SEQ ID NO: 66)

SEQ ID NO: 67 região HCDR3 prot de MS-Roche No.7.9H2 x 7.12L2;
proteína/1; sequência artificial

GKGNTHKPYGYVRYFDV (SEQ ID NO: 67)

SEQ ID NO: 68 região HCDR3 prot de MS-Roche No.7.9H4 x 7.12L2;
DNA; sequência artificial

GGTAAGGGTAATACTCATAAGCCTTATGGTTATGTTTCGTTATTTTG
ATGTT (SEQ ID NO: 68)

SEQ ID NO: 69 região HCDR3 prot de MS-Roche No.7.9H4 x 7.12L2;
proteína/1; sequência artificial

GKGNTHKPYGYVRYFDV (SEQ ID NO: 69)

SEQ ID NO: 70 região HCDR3 prot de MS-Roche No.7.11 H1 x
7.11L1; DNA; sequência artificial

GGTAAGGGTAATACTCATAAGCCTTATGGTTATGTTTCGTTATTTTG
ATGTT (SEQ ID NO: 70)

SEQ ID NO: 71 região HCDR3 prot de MS-Roche No.7.11H1 x 7.11L1;
proteína/1; sequência artificial

GKGNTHKPYGYVRYFDV (SEQ ID NO: 71)

SEQ ID NO: 72 região HCDR3 prot de MS-Roche No.7.11H1 x 7.2L1;
DNA; sequência artificial

GGTAAGGGTAATACTCATAAGCCTTATGGTTATGTTTCGTTATTTTG
ATGTT (SEQ ID NO: 72)

SEQ ID NO: 73 região HCDR3 prot de MS-Roche No.7.11H1 x 7.2L1;
proteína/1; sequência artificial

GKGNTHKPYGYVRYFDV (SEQ ID NO: 73)

SEQ ID NO: 74 região LCDR3 prot de MS-Roche No.3.6H5 x 3.6L2;
DNA; sequência artificial

CAGCAGACTTATAATTATCCTCCT (SEQ ID NO: 74)

SEQ ID NO: 75 região LCDR3 prot de MS-Roche No.3.6H5 x 3.6L2;
proteína/1; sequência artificial

QQTYNYP (SEQ ID NO: 75)

SEQ ID NO: 76 região LCDR3 prot de MS-Roche No.3.6H8 x 3.6L2;
DNA; sequência artificial

CAGCAGACTTATAATTATCCTCCT (SEQ ID NO: 76)

SEQ ID NO: 77 região LCDR3 prot de MS-Roche No.3.6H8 x 3.6L2;
proteína/1; sequência artificial

QQTYNYP (SEQ ID NO: 77)

SEQ ID NO: 78 região LCDR3 prot de MS-Roche No.7.4H2 x 7.2L 1;
DNA; sequência artificial

CAGCAGATTTATTCTTTTCCTCAT (SEQ ID NO: 78)

SEQ ID NO: 79 região LCDR3 prot de MS-Roche No.7.4H2 x 7.2L1;
proteína/1; sequência artificial

QQIYSFPH (SEQ ID NO: 79)

SEQ ID NO: 80 região LCDR3 prot de MS-Roche No.7.9H2 x 7.12L2;
DNA; sequência artificial

CTTCAGCTTTATAATATTCCTAAT (SEQ ID NO: 80)

SEQ ID NO: 81 região LCDR3 prot de MS-Roche No.7.9H2 x 7.12L2;
proteína/1; sequência artificial

LQLYNIPN (SEQ ID NO: 81)

SEQ ID NO:82 região LCDR3 prot de MS-Roche No.7.9H4 x 7.12L2;
DNA; sequência artificial

CTTCAGCTTTATAATATTCCTAAT (SEQ ID NO: 82)

SEQ ID NO: 83 região LCDR3 prot de MS-Roche No.7.9H4 x 7.12L2;
proteína/1; sequência artificial

LQLYNIPN (SEQ ID NO: 83)

SEQ ID NO: 84 região LCDR3 prot de MS-Roche No.7.11H1 x 7.11L1;
DNA; sequência artificial

CAGCAGGTTTATTCTCCTCCTCAT (SEQ ID NO: 84)

SEQ ID NO: 85 região LCDR3 prot de MS-Roche No.7.11H1 x 7.11 L1;
proteína/1; sequência artificial

QQVYSPPH (SEQ ID NO: 85)

SEQ ID NO: 86 região LCDR3 prot de MS-Roche No.7.11H1 x 7.2L1;
DNA; sequência artificial

CAGCAGATTTATTCTTTTCCTCAT (SEQ ID NO: 86)

SEQ ID NO: 87 região LCDR3 prot de MS-Roche No.7.11H1 x 7.2L1;
proteína/1; sequência artificial

QQIYSFPH (SEQ ID NO: 87)

SEQ ID NO: 88 região VH de MS-Roche No.7.9H7; DNA; sequência
artificial

Caggtgcaattggtggaaagcggcggcggcctggtgcaaccgggcggcagcctgctgag
ctgcgcgccctccggatttaccttagcagctatgcgatgagctgggtgcgccaagcccctggga
agggtctcgagtgggtgagcgtattaatgcttctggtactcgtacttattatgctgattctgtaaggg
tcgtttaccatttcacgtg

ataattcgaaaaacaccctgtatctgcaaatgaacagcctgctgcggaagatacggccgtgtat
tattgcgcgctggtaagggtaataactcataagccttatggttatgttcgattttgatgtttggggcca
aggcaccctggtgacggttagctca (SEQ ID NO: 88)

SEQ ID NO: 89 região VH prot de MS-Roche No.7.9H7; proteína/1;
sequência artificial

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL
EWVSAINASGTRTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCARGKGNTHKPYGYVRYFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:
89)

SEQ ID NO: 90 região VL de MS-RocheNo.7.9H7; DNA; sequência
artificial

Gatatcgtgctgaccagagcccggcgaccctgagcctgtctccgggccaacgtgcgaccctg
agctgcagagcgagccagagcgtgagcagcagctatctggcgtggtaccagcagaaaccag
gtcaagcaccgcg

tctattaatttatggcgcgagcagccgtgcaactgggggtcccggcgcgtttagcggctctggatcc
ggcacggattttaccctgaccattagcagcctggaacctgaagactttgcgacttattatgcctca
gattataatgatg cctattaccttggccagggtacgaaagttgaaattaaacgtacg (SEQ ID

NO: 90)

SEQ ID NO: 91 região VL prot de MS-Roche No.7.9H7; proteína/1; sequência artificial

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL
LIYGASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFATYYCLQIYNM
PITFGQGTKVEIKRT (SEQ ID NO: 91)

SEQ ID NO: 92 região HCDR3 de MS-Roche No.7.9H7; DNA; sequência artificial

Ggtaagggtaataactcataagccttatgggtatggttcgtattttgatggt (SEQ ID NO: 92)

SEQ ID NO: 93 região HCDR3 prot de MS-Roche No.7.9H7; proteína/1; sequência artificial

GKGNTHKPYGYVRYFOV (SEQ ID NO: 93)

SEQ ID NO: 94 região LCDR3 de MS-Roche No.7.9H7; DNA; sequência artificial

Cttcagatttataatgcctatt (SEQ ID NO: 94)

SEQ ID NO: 95 região LCDR3 prot de MS-Roche No.7.9H7; proteína/1; sequência artificial

LQIYNMPI (SEQ ID NO:95)

[00117] Mais sequências ilustrativas são mostradas na listagem de sequência anexa e são também mostradas nas tabelas anexas, em particular Tabelas 1, 8 e 10.

[00118] As Figuras mostram:

[00119] **Figura 1 Sumário de sequência de biblioteca HuCAL®-Fab1**

[00120] A numeração está de acordo com VBASE exceto pela lacuna na posição VLλ 9. Em VBASE a lacuna é ajustada na posição 10 (Chothia e outros, 1992). No resumo de sequência todos os três resíduos CDR3 que foram mantidos constantes são indicados. Sequências correspondentes empregadas para a biblioteca HuCAL-Fab1 podem ser encontradas na listagem de sequência anexa.

A: sequência de aminoácido

B: sequência de DNA

[00121] **Figura 2 Vetor de mostra de Fab pMORPH®18_Fab**

[00122] Mapa do vetor e sequência de DNA incluindo locais de restrição

[00123] **Figura 3 Vetor de expressão de Fab pMORPH®x9_Fab**

[00124] Mapa do vetor e sequência de DNA incluindo locais de restrição

[00125] **Figura 4 Sequências dos fragmentos Fab de origem de MS-Roche-3, MS-Roche-7 e MS-Roche-8**

A: sequência de aminoácido

B: sequência de DNA

[00126] **Figura 5** Imunofluorescência indireta de placas amiloide de uma seção criostática de córtex temporal humano. As placas foram marcadas com Fab MS-RNo.32 (painéis superiores) e Fab MS-RNo.7.4 (painéis inferiores) a 20 µg/ml (painéis da esquerda) e 5 µg/ml (painéis da direita) sob condições de bloqueio estringentes. MS-RFab ligado foi revelado através de Cy3-anti-humano de cabra.

[00127] **Figura 6** Imunofluorescência indireta de placas amiloide de uma seção criostática de córtex temporal humano. As placas foram marcadas com IgG1 MS-RNo.3.3 (painéis superiores) e IgG1 MS-RNo.7.12 (painéis inferiores) a 0,05 µg/ml (painéis da esquerda) e 0,01 µg/ml (painéis da direita) sob condições de bloqueio estringentes. IgG1 MS-R ligado foi revelado através de Cy3-anti-humano (H+L) de cabra.

[00128] **Figura 7** Imunofluorescência indireta de placas amiloide de uma seção criostática de córtex temporal humano usando anticorpos após maturação de afinidade final. As placas foram marcadas com IgG1 MS-RNo.7.9.H7 (MAB 31, painel superior), IgG1 MS-RNo.7.11.H1 x 7.2.L1 (MAB 11, painel do meio) e MSRNo.3.4.H7, painel inferior). Anticorpos foram usados a 0,05 µg/ml (painéis da

esquerda) e 0,01 $\mu\text{g/ml}$ (painéis da direita) sob condições de bloqueio estridentes. Anticorpo IgG1 MS-R ligado foi revelado através de Cy3-anti-humano (H+L) de cabra.

Escala: 8,5 mm = 150 μm .

[00129] **Figura 8** Ensaio de polimerização. Anticorpos anti-A β previnem a incorporação de A β biotinilado nos agregados de A β pré-formados.

[00130] **Figura 9** Ensaio de despolimerização. Anticorpos anti-A β induzem a liberação de A β biotinilado de A β agregado.

[00131] **Figura 10** Decoração *in vivo* de placas amiloide em um camundongo transgênico duplo APP/PS2 após injeção intravenosa de 1 mg de IgG MS-RocheNo.7.9.H2 x 7.12.L2. Após três dias o camundongo foi perfundido com solução salina tamponada com fosfato e sacrificado. A presença de IgG humano ligado a placas amiloide foi revelada através de microscopia confocal após marcação de seções criostáticas do córtex central com um conjugado de IgG-anti-humano-Cy3 (painel B). A mesma seção foi marcada com um anticorpo monoclonal de camundongo anti-Beta (conjugado BAP-2-Alex488, painel A) para visualizar a posição de placas amiloide. Canais vermelho (painel B) e verde (painel A) individuais, imagem unida (painel D) e sinais co-localizados (painel C) são mostrados.

Escala: 1 cm = 50 μm

[00132] **Figura 11** Decoração *in vivo* de placas amiloide em um camundongo transgênico duplo APP/PS2 após injeção intravenosa de 1 mg de IgG MS-Roche No.7.9.H4 x 7.12.L2. Condições experimentais e procedimento de tingimento eram idênticos àqueles descritos na legenda da Figura 10.

Escala: 1,6 cm = 50 μm

[00133] **Figura 12** Decoração *in vivo* de placas amiloide em um camundongo transgênico duplo APP/PS2 após injeção intravenosa de

1 mg de IgG MS-Roche No.7.11.H1 x 7.2.L1 (MAB 11). Condições experimentais e procedimento de tingimento eram idênticos àqueles descritos na legenda da Figura 10.

Escala: 1,4 cm = 70 μ m

[00134] **Figura 13** Decoração *in vivo* de placas amiloide em um camundongo transgênico duplo APP/PS2 após injeção intravenosa de 2 mg de IgG MS-Roche No.7.9H7 (MAB 31) nos dias 0, 3 e 6. Após nove dias o camundongo foi perfundido com solução salina tamponada com fosfato e sacrificado. A presença de IgG humano ligado a placas amiloide foi revelada através de microscopia após marcação de seções criostáticas do córtex frontal com um conjugado de IgG anti-humano de cabra-Cy3 (painel B). A mesma seção foi marcada com um anticorpo monoclonal de camundongo anti-Abeta (conjugado BAP-2-Alex488, painel A) para visualizar a posição de placas amiloide. Canais vermelho (painel B) e verde (painel A) individuais, imagem unida (painel D) e sinais co-localizados (painel C) são mostrados.

Escala: 1,6 cm = 80 μ m (painéis A, B, C); 1,0 cm = 50 μ m (painel D)

[00135] **Figura 14** Decoração *in vivo* de placas amiloide em um camundongo transgênico duplo APP/PS2 após injeção intravenosa de 2 mg de IgG MS-Roche No.7.11.H1 x 7.2.L1 (MAB 11) nos dias 0, 3 e 6. Condições experimentais e procedimento de tingimento eram idênticos àqueles descritos na legenda da Figura 13.

Escala: 1,6 cm = 80 μ m

[00136] **Figura 15** Análise de ligação de anticorpos anti-A β à APP de superfície celular. A ligação de anticorpo a células HEK293 transfectadas com APP humana e células de controle não-transfectadas foi analisada através de citometria de fluxo.

[00137] Os exemplos ilustram a invenção.

Exemplo 1: Construção e Avaliação de uma Biblioteca de

Anticorpo Combinatório Humano (HuCAL®-Fab 1)Clonagem de HuCAL®-Fab 1

[00138] HuCAL®-Fab 1 é uma biblioteca de anticorpo humano modular, completamente sintética, no formato de fragmento de anticorpo Fab. HuCAL®-Fab 1 foi montada começando de uma biblioteca de anticorpo no formato de cadeia simples (HuCAL®-scFv; Knappik (2000), *J. Mol. Biol.* 296, 57-86).

[00139] *Posições VL 1 e 2.* Os genes master HuCal® originais foram construídos com seus terminais N autênticos: VL λ 1: QS (CAGAGC); VL λ 2: QS (CAGAGC) e VL λ 3: SY (AGCTAT). Sequências contendo esses aminoácidos são mostradas no WO 97/08320. Durante a construção da biblioteca HuCAL®, os dois primeiros aminoácidos foram mudados para DI para facilitar a clonagem da biblioteca (local EcoRI). Todas as bibliotecas HuCAL® contêm genes VL λ com o local EcoRI GATATC (DI) na extremidade 5'. Todos os genes kappa HuCAL® (genes master e todos os genes da biblioteca) contêm DI na extremidade 5' (Figuras 1A e B).

[00140] *Posição VH 1.* Os genes master HuCAL® originais foram construídos com seus terminais N autênticos: VH1A, VH1B, VH2, CH4 e VH6 com Q (=CAG) como o primeiro aminoácido e VH3 e VH5 com E (=GAA) como o primeiro aminoácido. Sequências contendo esses aminoácidos são mostradas no WO 97/08320. Durante a clonagem da biblioteca HuCAL®, o aminoácido na posição 1 de VH foi mudado para Q (CAG) em todos os genes VH (Figuras 1A e B).

Projeto das bibliotecas de CDR

[00141] *Posição V κ 1/V κ 3 85.* Por causa do procedimento de mutagênese de cassete usado para introduzir a biblioteca de CDR3 (Knappik (2000), loc. cit.), a posição 85 de V κ 1/V κ 3 pode ser ou T ou V. Desse modo, durante a construção da biblioteca HuCAL®-scFv1, a posição 85 de V κ 1/V κ 3 foi variada como segue: V κ 1 original, 85T

(códon ACC); biblioteca $V\kappa 1$, 85T ou 85V (Códons TRIM ACT ou GTT); $V\kappa 3$ original, 85V (códon GTG); biblioteca $V\kappa 3$, 85T ou 85V (códons TRIM ACT ou GTT); o mesmo se aplica a HuCAL®-Fab1.

Projeto de CDR3. Todos os resíduos de CDR3, que foram mantidos constantes, são indicados nas Figuras 1 A e B.

[00142] *Comprimento de CDR3.* A distribuição do comprimento de CDR3 projetada é como segue. Os resíduos, que foram variados, são mostrados em parênteses (x) na Figura 1; CDR3 de kappa V, resíduos de 8 aminoácidos (posições 89 a 96) (ocasionalmente 7-10 resíduos), com Q89, S90 e D92 fixos; e CDR3 de VH, 5 a 28 resíduos de aminoácido (posições 95 a 102) (ocasionalmente 4-28), com D101 fixos.

[00143] HuCAL®-Fab 1 foi clonada em um vetor de expressão de fagemídeo pMORPH®18_Fab1 (Figura 2). Este vetor compreende o fragmento Fd com uma sequência de sinal phoA fundida no C-terminal a uma proteína III de gene truncado de fago de filamento, e ainda compreende a VL-CL de cadeia leve com uma sequência de sinal ompA. Ambas cadeias estão sob controle do operon lac. Os domínios constantes $C\lambda$, $C\kappa$ e CH1 são genes sintéticos completamente compatíveis com o sistema molecular de HuCAL® (Knappik, (2000), loc. cit.).

[00144] A cadeia VH integral (fragmento *MunI/StyI*) foi substituída com um fragmento simulado de 1205 pb contendo a unidade de transcrição de β -lactamase (*bla*), desse modo facilitando as etapas subsequentes para preparação de fragmento de vetor e permitindo a seleção de remoção de VH completa.

[00145] Após substituição de VH, $VL\lambda$ foi removida por *EcoRI/Dralli* e $VL\kappa$ por *EcoRI/BsIWI* e substituída com fragmento de gene de fosfatase alcalina bacteriana (*bap*) (1420 pb). Como a variabilidade das cadeias leves é menor do que aquela das cadeias pesadas,

clonagem foi iniciada com as bibliotecas de cadeia leve. As bibliotecas de cadeia leve VL λ e VL κ diversificadas em L-CDR3, que foram geradas para biblioteca de HuCAL®-scFv (Knappik (2000), loc. cit.) foram também usadas para clonagem de HuCAL®-Fab1. No caso de λ , elas consistiam na estrutura principal λ 1-, λ 2- e λ 3-HuCAL® e tinham uma variabilidade total de $5,7 \times 10^6$. Fragmentos de VL λ foram amplificados por 15 ciclos de PCR (polimerase Pwo) com primers 5'-GTGGTGGTTCCGATATC-3' (SEQ ID NO:28) e 5'-AGCGTCACACTCGGT GCGGCTTTCGGCTGGCCAAGAACGGTTA-3' (SEQ ID NO:29). Os produtos de PCR foram digeridos com *EcoRV/DraIII* e purificados com gel. No caso da biblioteca de VL λ , a simulação de bap foi removida pelo *EcoRV/DraIII* do vetor da biblioteca. 2 μ g de vetor purificado com gel foram ligados com excesso molar de 3 vezes de cadeias VL λ por 16 horas a 16° C, e as misturas de ligação foram eletroforadas em 800 μ l de células TOP10F de *E. coli* (Invitrogen), dando ao todo $4,1 \times 10^8$ colônias independentes. Os transformantes foram amplificados cerca de 2000 vezes em 2 x YT/1% de glicose/34 μ g/ml de cloramfenicol/100 μ g/ml de ampicilina, coletados e armazenados em 20% (p/v) de glicerol a -80° C. As bibliotecas de κ compreendem os genes master κ 1-, κ 2-, κ 3 e κ 4-HuCAL® com uma variabilidade total de $5,7 \times 10^6$. Cadeias VL κ foram obtidas através de digestão de restrição com *EcoRV/BsIWI* e purificadas com gel. No caso da biblioteca de VL κ , a simulação de bap foi removida pelo *EcoRV/BsIWI* do vetor de biblioteca. 2 μ g de vetor purificado com gel foram misturados com um excesso molar de 5 vezes de cadeias VL κ . Ligação e transformação em células TOP10F de *E. coli* (Invitrogen) foram realizadas conforme descrito para cadeias VL λ , dando ao todo $1,6 \times 10^8$ colônias independentes. O DNA das duas bibliotecas de cadeia leve foi preparado e a simulação de bla foi

removida pelo *MunI/StyI*, desse modo gerando dois vetores para inserção das sub-bibliotecas de VH. As bibliotecas de VH HuCAL®-scFv foram usadas para a geração de HuCAL®-Fab1. As bibliotecas de VH HuCAL®-scFv consistiam nos genes master VH1A/B-6 diversificados com dois cassetes de biblioteca de trinucleotídeo VH-CDR3 diferindo no comprimento de CDR3 separadamente, e cada biblioteca de VH combinou com a biblioteca de VL κ e VL λ . Para a geração da HuCAL®-Fab DNA dessas bibliotecas de VH foi preparado preservando a variabilidade original. O DNA foi digerido com *MunI/StyI* e purificado com gel. Um excesso molar de 5 vezes das cadeias VH foi ligado com 3 μ g do vetor da biblioteca VL λ e com 3 μ g do vetor da biblioteca VL κ por 4 horas a 22° C. As misturas de ligação foram eletroforadas para cada vetor em 1200 μ l de células TOP10F de *E. coli* (Invitrogen), dando no total $2,1 \times 10^{10}$ colônias independentes. Os transformantes foram amplificados cerca de 4000 vezes em 2 x YT/1% de glicose/34 μ g/ml de cloramfenicol/10 μ g/ml de tetraciclina, coletados e armazenados em 20% (p/v) de glicerol a -80° C. Como controle de qualidade a cadeia leve e a cadeia pesada de clones de sinal foram sequenciadas com 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' (SEQ ID NO: 30) e 5'-TACCGTTGCTCTTCACCCC-3' (SEQ ID NO: 31), respectivamente.

Resgate de fagemídeo, amplificação e purificação de fago

[00146] HuCAL®-Fab1 foi amplificada em um meio 2 x TY contendo 34 μ g/ml de cloranfenicol, 10 μ g/ml de tetraciclina e 1% de glicose (2 x TY-CG). Após infecção de fago auxiliar (VCSM13) a 37° C em um OD₆₀₀ de cerca de 0,5, centrifugação e ressuspensão em 2 x TY/34 μ g/ml de cloranfenicol/50 μ g/ml de canamicina as células foram cultivadas da noite para o dia a 30° C. Os fagos foram precipitados com PEG a partir do sobrenadante (Ausubel (1998), *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Nova York, USA), ressuspensos em PBS/glicerol a 20% e armazenados a -80° C.

Amplificação de fago entre duas séries de "panning" foi realizada como segue: células TG1 de fase log média foram infectadas com fago eluído e postas em placa em ágar LB suplementado com 1% de glicose e 34 µg/ml de cloranfenicol. Após incubação da noite para o dia incubação a 30° C de colônias foram raspadas, ajustadas para um OD₆₀₀ de 0,5 e fago auxiliar adicionado conforme acima descrito.

Exemplo 2: "panning" de fase sólida

[00147] Cavidades das placas de microtitulação MaxiSorp® F96 (Nunc) foram revestidas com 100 µl de 2,5 µM de peptídeo Aβ humano (1-40) (Bachem) dissolvido em TBS contendo NaN₃ (0,05% v/v) e a placa vedada foi incubada por 3 dias a 37° C onde o peptídeo está propenso a agregar sobre a placa. Após bloqueio com 5% de leite seco não-gorduroso em TBS, 1-5 x 10¹² de fago de HuCAL®-Fab purificado como acima foram adicionados por 1 hora a 20° C. Após várias etapas de lavagem, os fagos ligados foram eluídos através de eluição de pH com 500 mM de NaCl, 100 mM de glicina pH 2,2 e subsequente neutralização com TRIS-Cl 1M pH 7. Três séries de "panning" foram realizadas com a amplificação de fago realizada entre cada série conforme acima descrito, a estringência de lavagem foi aumentada de série para série.

Exemplo 3: Subclonagem de fragmentos Fab selecionados para expressão

[00148] As inserções de codificação de Fab dos fragmentos de HuCAL®-Fab foram subclonadas no vetor de expressão pMORPH®x7_Fs para facilitar expressão rápida de Fab solúvel. A preparação de DNA dos clones de HuCAL®-Fab selecionados foi digerida com *XbaI/EcoRI*, desse modo cortando a inserção de codificação de Fab (ompA-VL e phoA-Fd). Subclonagem das inserções purificadas no vetor de corte *XbaI/EcoRI* pMORPH®x7, antes carregando uma inserção de scFv, leva a um vetor de expressão Fab

chamado pMORPH[®]x9_Fab1 (Figura 3). Fab expresso neste vetor carrega duas lacunas C terminais (FLAG e Strep) para detecção e purificação.

Exemplo 4: Identificação de fragmentos Fab de ligação de A β através de ELISA

[00149] Cavidades das placas de microtitulação MaxiSorp[®] F384 (Nunc) foram revestidas com 20 μ l de 2,5 μ M de peptídeo A β humano (1-40) (Bachem) dissolvido em TBS contendo NaN₃ (0,05% v/v) e a placa vedada foi incubada por 3 dias a 37^o C onde o peptídeo está propenso a agregar sobre a placa. Expressão de Fab individual foi induzida com 1 mM de IPTG por 16 horas a 22^o C. Fab solúvel foi extraído de *E. coli* através de lise BEL (ácido bórico, NaCl, EDTA e tampão contendo lisozima de pH 8) e usado em um ELISA. O fragmento FAB foi detectado com fosfatase alcalina-anticorpo anti-Fab de cabra conjugado (Dianova/Jackson Immuno Research). Após excitação a 340 nm a emissão a 535 nm foi lida após adição de substrato de fluorescência AttoPhos (Roche Diagnostics).

Exemplo 5: Otimização de fragmentos de anticorpo

[00150] A fim de otimizar a afinidade de ligação dos fragmentos de anticorpo de ligação de A β selecionados, alguns dos fragmentos Fab, MS-Roche-3 (MSR-3), MS-Roche-7 (MSR-7) e MS-Roche-8 (MSR-8) (Figura 4), foram usados para construir uma biblioteca de fragmentos de anticorpo Fab através da substituição da cadeia VL κ ₃ de origem pelo grupo de todas as cadeias κ 1-3 kappa diversificadas em CDR3 da biblioteca HuCAL[®] (Knappik e outros, 2000).

[00151] Os fragmentos Fab MS-Roche-3, 7 e 8 foram clonados através de *Xba*I/*Eco*RI de pMORPH[®]x9_FS em PMORH[®]18, um vetor à base de fagemídeo para mostra de fago de fragmentos de fago, para gerar pMORPH[®]18_Fab1 (Figura 2). Um grupo de cadeia kappa foi clonado em pMORPH[®]18_Fab1 através dos locais de restrição

XbaI/SphI.

[00152] A biblioteca de otimização de Fab resultante foi avaliada através de "panning" contra peptídeo de A β humano agregado (1-40) revestido em um apoio sólido conforme descrito no exemplo 2. Clones otimizados foram identificados através de classificação koff em um ensaio Biacore conforme descrito no Exemplo 8. Os clones otimizados MS-Roche- 3.2, 3.3, 3.4, 3.6, 7.2, 7.3, 7.4, 7.9, 7.11, 7.12, 8.1, 8.2 foram ainda caracterizados e mostraram afinidade e atividade biológica aperfeiçoadas comparado com o fragmento de iniciação MS-Roche-3, MS-Roche-7 e MS-Roche-8 (Figura 4). As CDRs listadas referem-se ao gene VH3kappa3 de anticorpo baseado em consenso de HuCAL $\text{\textcircled{R}}$. O fragmento Fab MS-Roche-7.12 foi obtido através de clonagem de HCDR3 do clone de origem MS-R 7 em uma biblioteca HuCAL $\text{\textcircled{R}}$, carregando diversidade em todas as 6 regiões CDR usando um procedimento de projeto idêntico àquele para cassetes de CDR3 descritos em Knappik e outros, 2000. Os cassetes de biblioteca foram projetados com forte tendência para a distribuição natural conhecida de aminoácidos e seguindo o conceito de conformações de CDR canônicas estabelecido por Allazikani (Allazikani e outros, 1997). No entanto, em contraste com os genes master de HuCAL $\text{\textcircled{R}}$, o clone de MS-Roche7.12 contém o aminoácido S na posição 49 da cadeia VL (vide Tabela 1 anexa).

[00153] Os Fabs otimizados após a primeira série de maturação de afinidade mostraram características aperfeiçoadas sobre os clones de MS-Roche-3, MS-Roche-7 e MS-Roche-8 de iniciação (Figura 4). As afinidades de ligação dos Fabs maduras para A β 1-40 e A β 1-42 foram significativamente aumentadas dando valores K_D na faixa de 22-240 nM em comparação com 850-1714 nM dos clones de origem (Tabela 3). Análise imunohistoquímica de placas amiloide em seções cerebrais AD humanas também mostrou um perfil de tingimento

significativamente maior dos clones maduros, isto é, melhor sinal para razões de base foi obtido e tingimento de placa positivo foi detectado em concentrações relativamente baixas dos Fabs maduros (Figura 5).

[00154] Para otimização adicional, as regiões CDR2VH e as regiões CDR1VL de um conjunto de fragmentos de anticorpo derivado de MS-Roche-3, -7 e -8 otimizado com L-CDR3 (Tabela 1; Figura 4) foram otimizadas através de mutagênese de cassete usando mutagênese direcionada a trinucleotídeo (Virnekäs e outros, 1994). Desse modo, um cassete de HCDR2 de base de trinucleotídeo e um cassete de LCDR1 baseado em trinucleotídeo foram construídos usando um procedimento de projeto idêntico àquele para cassetes de CDR3 descritos em Knappik e outros, 2000. Os cassetes de biblioteca foram projetados com forte tendência para a distribuição natural conhecida de aminoácidos e seguindo o conceito de conformações de CDR canônicas estabelecido por Allazikani (Allazikani e outros, 1997). O protocolo usado para a otimização dos fragmentos de anticorpo selecionados iniciais imitaria o processo de maturação de afinidade através de hipermutação somática observada durante a resposta imune natural.

[00155] As bibliotecas resultantes foram avaliadas separadamente conforme acima descrito levando a clones otimizados ou na região H-CDR2 ou na L-CDR1. Todos os clones foram identificados como acima por um koff aperfeiçoado com relação a fibras de A β 1-40 após uma classificação koff no Biacore e mostraram afinidade aperfeiçoada ou para A β 1-40 ou A β -42 ou ambos quando comparados com clone de origem correspondente (Tabela 3). A Tabela 1 contém as características da sequência dos clones de origem bem como das sequências dos clones otimizados. As CDRs listadas referem-se ao VH3kappa3 do gene de anticorpo baseado em consenso de HuCAL®. Por exemplo, a afinidade do Fab de origem Ms-Roche-7 com relação a

Ab1-40 foi melhorada mais de 35 vezes de 1100 nM a 31 nM após otimização de L-CDR3 (MS-Roche-7.9) e melhorou mais para 5 nM após otimização do H-CDR2 (MS-Roche-7.9Hz) conforme ilustrado na Tabela 3. O procedimento de otimização de H-CDR2 e L-CDR1 não apenas aumentou a afinidade mas também resultou para alguns dos clones em um tingimento significativamente aperfeiçoado de placas amiloide em seção de cérebro AD, conforme particularmente visto com MS-Roche-7.9H2 e 7.9H3.

Tabela 1

Nome do Ligante	L-CDR1	pos.49	L-CDR2	pos.85	L-CDR3	H-CDR1	pos.47	H-CDR2	H-CDR3
MS-Roche No.3	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQVYNPPV	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	LTHYARYVRYFDV
MS-Roche No.3.1	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSVPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	LTHYARYVRYFDV
MS-Roche No.3.2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQIYSYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.3	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	HQMSSYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	L THYARYRYFDV
MS-Roche No.3.4	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.5	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.6	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	L THYARYRYFDV
MS-Roche No.3.2.H1	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQIYSYPP	GFTFSSYAMS	W	AISEHGLNIYYADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.2.H2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQIYSYPP	GFTFSSYAMS	W	AISQRGQFTYYADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.3.H1	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	HQMSSYPP	GFTFSSYAMS	W	VISEKSRFIYYADSVKG	LTHYARYVRYFDV
MS-Roche No.3.3.H2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	HQMSSYPP	GFTFSSYAMS	W	VISQESQYKYYADSVKG	L THYARYRYFDV

Tabela 1 (continuação)

Nome do Ligante	L-CDR1	pos.49	L-CDR2	pos.85	L-CDR3	H-CDR1	pos.47	H-CDR2	H-CDR3
MS-Roche No.3.3.H3	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	HQMSSYPP	GFTFSSYAMS	W	AISQNGFH IYYADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.4.H1	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QPTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISSETSIRKYYADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.4.H2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QPTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	VIDMVGHTYYADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.4.H3	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QPTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	VISQTGRKIYYADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.4.H4	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QPTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISSETGMHIYYADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.4.H5	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QPTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	VISQVGAHIYYADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.4.H6	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT'	T	QPTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISESGWSTYYADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.4.H7	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QPTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	VISETGKNIYVADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.4.H8	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QPTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISEHGRFKYYADSVKG	LTHYARYVRYFDV
MS-Roche No.3.4.H9	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QPTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISESSKNKYYADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.4.H10	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QPTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISESGRGKYYADSVKG	LTHYARYRYFDV

Tabela 1 (continuação)

Nome do Ligante	L-CDR1	pos.49	L-CDR2	pos.85	L-CDR3	H-CDR1	pos.47	H-CDR2	H-CDR3
MS-Roche No.3.4.H11	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QPTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISEFGKN IYYADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.4. H12	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QPTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	VISQTGQN IYYADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.4.H13	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QPTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISEQGRNIYYADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.4.H14	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QPTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	ISESGQYKYADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.4.H16	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QPTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISESGVNIYYADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.4.H17	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QPTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISEFGQFIYYADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.4.H18	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QPTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISQQSNFIYYADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.4.L7	RASQRLGRLYLA	Y	GASSRAT	T	QPTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.4.L8	RASQWITKSYLA	Y	GASSRAT	T	QPTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.4.L9	RASRRIHVYYLA	Y	GASSRAT	T	QPTYDYPP	GFTFSSY AMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.4.L 11	RASQLVGRAYLA	Y	GASSRAT	T	QPTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	LTHYARYRYFDV

Tabela 1 (continuação)

Nome do Ligante	L-CDR1	pos.49	L-CDR2	pos.85	L-CDR3	H-CDR1	pos.47	H-CDR2	H-CDR3
MS-Roche No.3.6.H1	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYP	GFTFSSYAMS	W	VISESGQYKYYADSVK	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.6.H2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYP	GFTFSSYAMS	W	VISERGINTYYADSVK	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.6.H3	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYP	GFTFSSYAMS	W	VISETGKFIYYADSVK	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.6.H4	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYP	GFTFSSYAMS	W	AISERGRHIYYADSVK	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.6.H5	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYP	GFTFSSYAMS	W	AISESGKTKYYADSVK	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.6.H6	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYP	GFTFSSYAMS	W	AISEHGTNIYYADSVK	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.6.H8	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYP	GFTFSSYAMS	W	AISEYSKFKYYADSVK	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.6.L 1	RASQFIQRFYLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVK	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.6.L2	RASQFLSRYYLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVK	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.7	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	FQLYSDPF	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVK	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche No.7.1	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	HQLYSSPY	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVK	GKGNTHKPYGYVRYFDV

Tabela 1 (continuação)

Nome do Ligante	L-CDR1	pos.49	L-CDR2	pos.85	L-CDR3	H-CDR1	pos.47	H-CDR2	H-CDR3
MS-Roche No.7.2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche No.7.3	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	HQVYSHPF	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche No.7.4	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQIYNFPH	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche No.7.5	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	HQVYSSPF	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche No.7.6	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	HQLYSPPY	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche No.7.7	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	HQVYSAPF	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche No.7.8	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	HQVYSFPI	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche No.7.9	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	LQIYNMPI	GTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche No.7.10	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYNPPH	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche No.7.11	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSPPH	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche No.7.12	RASQYVSSPYLA	S	GSSNRAT	V	LQL YNIPN	GFTFSSYGMS	W	NISGSGSSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF

Tabela 1 (continuação)

Nome do Ligante	L-CDR1	pos.49	L-CDR2	pos.85	L-CDR3	H-CDR1	pos.47	H-CDR2	H-CDR3
MS-Roche No.7.13	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	HQVYSPPF	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche No.7.2.H1	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AINANGLKKYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche No.7.2.H2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AINGTGMKKYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche No.7.2.H3	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AINANGYKTTYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche No.7.2.H4	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AINSKGSRIYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche No.7.2.H5	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AINATGRSKYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche No.7.2.H6	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AINARGNRTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche No.7.2.H7	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AINSRGS DTHYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche No.7.2.H8	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AINASGHKTTYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche No.7.2.L1	RASQYVDRTYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche No.7.2.L2	RASQYISFRYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV

Tabela 1 (continuação)

Nome do Ligante	L-CDR1	pos.49	L-CDR2	pos.85	L-CDR3	H-CDR1	pos.47	H-CDR2	H-CDR3
MS-Roche No.7.2.L4	RASQFIRRSYLA	Y	GASSRA T	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYY ADSVKG	GKGNTHKPYGYVRY FDV
MS-RocheNo.7.3.H1	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	HQVYSHPF	GFTFSSY AMS	W	AISAINKTYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRY FDV
MS-Roche No.7.3.L1	RASQYLHYGYLA	Y	GASSRA T	V	HQVYSHPF	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRY FDV
MS-Roche No.7.4.H1	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQIYNFPH	GFTFSSYAMS	W	AINATGYRTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRY FDV
MS-Roche No.7.4.H2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQIYNFPH	GFTFSSYAMS	W	AINYNNGARIYY ADSVKG	GKGNTHKPYGYVRY FDV
MS-Roche No.7.9.H1	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	LQIYNMPI	GFTFSSYAMS	W	AINANGQRKFYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRY FDV
MS-Roche No.7.9.H2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	LQIYNMPI	GFTFSSYAMS	W	AINADGNRKYY ADSVKG	GKGNTHKPYGYVRY FDV
MS-Roche No.7.9.H3	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	LQIYNMPI	GFTFSSYAMS	W	AINYQGNRKYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRY FDV
MS-Roche No.7.9.H4	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	LQIYNMPI	GFTFSSYAMS	W	AINAVGMKKFYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRY FDV
MS-Roche No.7.9.H5	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	LQIYNMPI	GFTFSSYAMS	W	AINHAGNKYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRY FDV

Tabela 1 (continuação)

Nome do Ligante	L-CDR1	pos.49	L-CDR2	pos.85	L-CDR3	H-CDR1	pos.47	H-CDR2	H-CDR3
MS-Roche No.7.9.L1	RASQRLSPRYLA	Y	GASSRAT	T	LQIYNMPI	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFD V
MS-Roche No.7.9.L2	RASQYLHKRYLA	Y	GASSRAT	T	LQIYNMPI	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFD V
MS-Roche No.7.9.H6	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AINARGNRYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFD V
MS-Roche No.7.9.H7	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	LQIYNMPI	GFTFSSYAMS	W	AINASGTRTYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFD V
MS-Roche No.7.9.H8	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	LQIYNMPI	GFTFSSYAMS	W	AINASGSKIYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFD V
MS-Roche No.7.9.H9	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	LQIYNMPI	GFTFSSYAMS	W	AINGKGNKYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFD V
MS-Roche No.7.11.H1	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSPPH	GFTFSSYAMS	W	GINAAGFRYY ADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFD V
MS-Roche No.7.11.H2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSPPH	GFTFSSYAMS	W	AINANGYKYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFD V
MS-Roche No.7.11.H3	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSPPH	GFTFSSYAMS	W	GINANGNRYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFD V
MS-Roche No.7.11.H4	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSPPH	GFTFSSYAMS	W	AINANGYKTYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFD V
MS-Roche No.7.,11.H5	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSPPH	GFTFSSYAMS	W	AINAHGQRYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFD V

Tabela 1 (continuação)

Nome do Ligante	L-CDR1	pos.49	L-CDR2	pos.85	L-CDR3	H-CDR1	pos.47	H-CDR2	H-CDR3
MS-Roche No. 7.11.L1	RASQRILRIYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSPPH	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFD V
MS-Roche No.7.12.H1	RASQYVFRRYLA	S	GSSNRAT	V	LQL YNIPN	GFTFSSYGMS	W	NINGNGNRKYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFD V
MS-Roche No.7.12.L1	RASQYVFRRYLA	S	GSSNRAT	V	LQL YNIPN	GFTFSSYGMS	W	NISGSGSSTYY ADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFD V
MS-Roche No.7.12.L2	RASQRFFYKYLA	S	GSSNRAT	V	LQL YNIPN	GFTFSSYGMS	W	NISGSGSSTYV ADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFD V
MS-Roche No.7.12.L3	RASQFVRRGFLA	S	GSSNRAT	V	LQL YNIPN	GFTFSSYGMS	W	NISGSGSSTYY ADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFD V
MS-Roche No.7.12.L4	RASQRLKRSYLA	S	GSSNRAT	V	LQL YNIPN	GFTFSSYGMS	W	NISGSGSSTYY ADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFD V
MS-Roche No.7.12.L5	RASQRLKRSYLA	S	GSSNRAT	V	LQL YNIPN	GFTFSSYGMS	W	NISGSGSSTYY ADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche No.7.12.L6	RASQYLWYRYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYGMS	W	NISGSGSSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFD V
MS-Roche No.7.12.L7	RASQWIRKTYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYGMS	W	NISGSGSSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFD V
MS-Roche No.8	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQLSSFPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	LLSRGYNGYYHKFDV
MS-Roche No.8.1	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQLSNYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	LLSRGYNGYYHKFDV

Tabela 1 (continuação)

Nome do Ligante	L-CDR1	pos.49	L-CDR2	pos.85	L-CDR3	H-CDR1	pos.47	H-CDR2	H-CDR3
MS-Roche No.8.2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQLSSYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKGLLSR	GYNGYYHKFDV
MS-Roche No.8.1.H1	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQLSNYPP	GFTFSSYAMS	W	AISRSGSNIYY ADSVKG	LLSRGYNGYYHKFDV
MS-Roche No.8.2.H1	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQLSSYPP	GFTFSSY AMS	W	AISITGRRKYY ADSVKG	LLSRGYNGYYHKFDV
MS-Roche No.8.2.H2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQLSSYPP	GFTFSSYAMS	W	AISRTGSKTYADSVKGLLSR	GYNGYYHKFDV
MS-Roche No.8.2.H4	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQLSSYPP	GFTFSSYAMS	W	ATSVKGKTYADSVKGLLSR	GYNGYYHKFDV
MS-Roche No.8.2.L1	RASQRVSGRYLA	Y	GASSRAT	T	QQLSSYPP	GFTFSSY AMS	W	AISGSGGSTYYADSVKGLLSR	GYNGYYHKFDV

[00156] Quanto às sequências pertencentes às sequências de consenso de HuCAL VH3 e Vκ3 vide Figura 1A.

Exemplo 6Construção de vetores de expressão de imunoglobulina de HuCAL®

[00157] *Clonagem de cadeia pesada.* O local de clonagem múltipla de pcDNA3.1 + (Invitrogen) foi removido (*NheI/ApaI*) e um material compatível com os locais de restrição usados para projeto de HuCAL® foi inserido para a ligação das sequências líder (*NheI/EcoRI*), domínios VH (*MunI*) e as regiões constantes de imunoglobulina (*BspI/ApaI*). A sequência líder (EMBL 83133) foi equipada com uma sequência Kozak (Kozak, 1987). As regiões constantes de IgG humano (PIR A02146), IgG4 (EMBL K01316) e IgA1 de soro (EMBL J00220) foram dissecadas em oligonucleotídeos de sobreposição com comprimento de cerca de 70 bases. Mutações silenciosas foram introduzidas para remover locais de restrição não-compatíveis com o projeto de HuCAL®. Os oligonucleotídeos foram unidos pela PCR de extensão de sobreposição. Durante a subclonagem de Fab em IgG, a sequência de DNA de VH de Fab é cortada com *Mfe I/Bip I* e ligada ao vetor IgG aberto através de *EcoR I/Bip I*. *EcoR I* (*g/aattc*) e *Mfe I* (*c/aattg*) compartilham extremidades coesas (*aatt*) e a sequência de DNA do local *Mfe I* original nas mudanças de Fab de: *c/aattg* para: *g/aattg* após ligação no vetor de expressão de IgG, desse modo destruindo ambos locais de *Mfe I* e *EcoR I*, e desse modo também leva a uma mudança de aminoácido de Q (códon: *caa*) para E (códon: *gaa*).

[00158] *Clonagem de cadeia leve.* O local de clonagem múltipla de pCDNA3.1/Zeo+ (Invitrogen) foi substituído por dois materiais diferentes. O material κ proveu locais de restrição para inserção de um κ líder (*NheI/EcoRV*), domínios V_{κ} de HuCAL®-scFv (*EcoRV/BsiWI*) e a região constante de cadeia κ (*BsiWI/ApaI*). Os locais de restrição correspondentes no material λ eram *NheI/EcoRV* (líder λ), *EcoRV/HpaI* (domínios V_{λ}) e *HpaI/ApaI* (região constante de cadeia λ). O líder κ (EMBL Z00022) bem como o líder λ (EMBL J00241) eram ambos

equipados com sequências Kozak. As regiões constantes das cadeias κ (EMBL L00241) e λ (EMBL M18645) foram montadas através de PCR de extensão de sobreposição conforme acima descrito.

[00159] *Geração de Células CHO expressando IgG.* Células CHO-K1 foram co-transfectadas com uma mistura equimolar de vetores de expressão de cadeias pesada e leve de IgG. Transfectantes duplamente resistentes foram selecionados com 600 $\mu\text{g/ml}$ de G418 e 300 $\mu\text{g/ml}$ de Zeocina (Invitrogen) seguido por diluição de limitação. O sobrenadante de clones únicos foi avaliado quanto à expressão de IgG através de ELISA de captura. Clones positivos foram expandidos em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de IgG-FCS ultrabaixo a 10% (Life Technologies). Após ajustar o pH do sobrenadante para 8,0 e filtragem estéril, a solução foi submetida à cromatografia de coluna A de proteína padrão (Poros 20A, PE Biosystems).

Exemplo 7: Análise "pepspot" com decapeptídeos

[00160] A sequência de aminoácido que segue compreendendo A β (1-42) foi dividida em 43 decapeptídeos se sobrepondo com uma mudança de estrutura de 1 aminoácido.

ISEVKM¹DAEF RHDSGYEVHH QKLVFFAEDV GSNKGAIIGL
MVGGVVI⁴²ATV IV (SEQ ID NO:414). Desse modo, DAEF
RHDSGYEVHH QKLVFFAEDV GSNKGAIIGL MVGGVVIA (SEQ ID
NO:27) conforme anexo representa aminoácidos 1 a 42 de peptídeo
A β 4/-A4.

[00161] Os 43 decapeptídeos foram sintetizados com acetilação N-terminal e ligação covalente C-terminal a uma folha de celulose ("pepspot") por um fornecedor comercial (Jerini BioTools, Berlin). A folha de celulose é incubada por 2 horas em uma plataforma de pedra com anticorpo monoclonal (2 $\mu\text{g/ml}$) em tampão de bloqueio (50 mM de HCl Tris, 140 mM de NaCl, 5 mM de NaEDTA, 0,05% de NP40 (Fluka), 0,25% de gelatina (Sigma), 1% de fração V de albumina de

soro bovino (Sigma), pH 7,4). A folha é lavada 3 vezes por 3 minutos em uma plataforma de pedra com TBS (10 mM de Tris.HCl, 150 mM de NaCl, pH 7,5). Ela é então umedecida com tampão de catodo (25 mM de base Tris, 40 mM de ácido 6-aminoexano, 0,01% de SDS, 20% de metanol) e transferida para uma pilha de tingimento semi-seco com a face do lado do peptídeo faceando uma membrana de PVDF (Biorad) de tamanho igual.

[00162] A pilha de tingimento semi-seco consiste em papéis de filtro recém-umidificados (Whatman No. 3) um pouco maiores do que a folha de peptídeo:

3 papéis umidificados com tampão de Catodo

a folha de peptídeo

uma folha de membrana de PVDF umidificada com metanol

3 papéis umidificados com tampão 1 Anodo (30 mM de base Tris, 20% de metanol)

3 papéis umidificados com tampão 2 Anodo (0,3 mM de base Tris, 20% de metanol).

[00163] A transferência é conduzida em uma densidade de corrente entre Catodo e Anodo de 0,8 mA/cm² por 40 minutos, o que é suficiente para eluir a maior parte do anticorpo da folha de celulose e depositá-lo sobre a membrana de PVDF. A membrana de PVDF é então trocada por uma 2^a membrana de PVDF e transferida por mais 40 minutos para assegurar eluição completa da folha de celulose. A membrana de PVDF é imersa em tampão de bloqueio por 10 minutos. Então Ig H+L anti-humano marcado com HRP (Pierce) é adicionado em uma diluição 1:1000 e a membrana é incubada em uma plataforma de pedra por 1 hora. Ela foi lavada 3x10 minutos com TBST (TBS com 0,005% de Tween20). A cor é desenvolvida através de imersão da membrana em uma solução feita de 3 mg de 4-cloronaftol dissolvido em 9 ml de metanol com 41 ml de PBS (20 mM de Na-fosfato, 150 mM

de NaCl, pH 7,2) e 10 µl de peróxido de hidrogênio a 30% (Merck). Após o desenvolvimento de pontos azuis-pretos a membrana é lavada extensivamente com água e seca. A determinação de "pepspot"s reativos a anticorpo é feita através de inspeção visual através de uma matriz de ponto transparente. Os epitopos do anticorpo em questão são definidos como a sequência de aminoácido mínima em peptídeos reativos. Para comparação anticorpos monoclonais de camundongo (BAP-2, BAP-1, BAP-17, BAP-21, BAP-24 e 4G8) são analisados da mesma maneira, exceto pelo uso de Ig anticamundongo marcado com HRP ao invés de Ig anti-humano.

[00164] É importante observar que a maturação de afinidade e conversão dos fragmentos de Fab monovalentes em anticorpo IgG1 de comprimento completo resultam geralmente em um pouco de ampliação da sequência de reconhecimento de epitopo conforme indicado pelo "pepspot" e análises ELISA. Isso pode estar relacionado ao recrutamento de mais pontos de contato na área de interação de anticorpo-antígeno como uma consequência da maturação de afinidade ou para uma ligação mais forte ao epitopo mínimo de modo que tais interações fracas com aminoácido adjacente podem ser detectadas. O último pode ser o caso quando peptídeos derivados de Aβ são sondados com anticorpos IgG de comprimento completo. Conforme ilustrado na Tabela 2 para a análise "pepspot", as sequências de reconhecimento dos epitopos N-terminais e médios são prolongadas por até três aminoácidos quando Fabs de origem e anticorpos IgG completamente amadurecidos correspondentes são comparados. No entanto, deve-se ter em mente que os decapeptídeos são modificados para ligação covalente no aminoácido C-terminal e este aminoácido então pode não ser facilmente acessível ao anticorpo de comprimento completo devido a impedimento estérico. Se este for o caso o último aminoácido C-terminal não contribui significativamente

para a sequência de reconhecimento de epítipo e uma redução potencial da sequência de reconhecimento mínima por um aminoácido na extremidade C-terminal tem que ser considerada na análise "pepspot" conforme usado na presente invenção.

Anticorpo	Posição	Posição
MSR-3 Fab	3-4	18-23
MSR-7 Fab	3-5	19-24
MSR-8 Fab	4-5	18-21
MSR-9 Fab	(1)3-9	18-24
MSR-10 Fab	(4-10)	19-20
MSR-11 Fab	3-7	(18-20)
MSR-26 Fab	3-5	(16)-19-23
MSR-27 Fab	(3)6-9	13-18(20)
MSR-29 Fab		14-16(20)
MSR-37 Fab	(4-6)	(19-24)
MSR-41 Fab	3-7	(17-21)
MSR-42 Fab	(4-9)	(18-24)
MSR 3.4.H7 IgG1	1-3	19-26
MSR 7.9.H2 IgG1	1-4	19-24
MSR 7.9.H7 IgG1	4-6	19-26
MSR 7.2.H2x7.2.L1 IgG1	(1-4) 5-9	18-26
MSR 7.11.H1x7.2.L1 IgG1	4-6	19-26
BAP-2	4-6	
4G8		19-20(23)
BAP-21		32-34
BAP-24		38-40
BAP-1	4-6	
BAP-17		38-40

Tabela 2: Análise "pepspot" de Fabs de ligação e anticorpos IgG de comprimento completo a decapeptídeos em uma folha de celulose. Os

números referem-se aos aminoácidos essenciais da sequência A β 1-40 que têm que estar presentes no decapeptídeo para ligação ótima de anticorpo. Uma reatividade de peptídeo fraca, e então uma contribuição fraca para o epítipo, é indicada em parênteses.

Exemplo 8: Determinação de valores K_D para ligação de anticorpo Fab MS-R e IgG MS-R a fibras A β 1-40 e A β 1-42 *in vitro* através de ressonância de plasmon de superfície (SPR)

[00165] A ligação de anticorpos anti-A β (Fabs e IgG1) a A β fibrilar foi medida online através de ressonância de plasmon de superfície (SPR), e as afinidades das interações moleculares foram determinadas conforme descrito por Johnson, *Anal. Biochem.* 1991, 198, 268-277, e Richalet-Sécordel, *Anal. Biochem.* 1997, 249, 165-173. Instrumentos Biacore2000 e Biacore3000 foram usados para essas medições. Fibras de A β 1-40 e A β 1-42 foram geradas *in vitro* através de incubação de peptídeos sintéticos em uma concentração de 200 μ g/ml em 10 mM de tampão de acetato de Na (pH 4,0) por três dias a 37° C. Análise de microscopia de elétron confirmou uma estrutura fibrilar para ambos peptídeos, A β 1-40 mostrando fibras predominantemente mais curtas (<1 μ m) e A β 1-42 predominantemente mais longas (>1 μ m). Essas fibras são supostas representar peptídeos A β agregados em cérebro AD humano mais proximamente do que as misturas mal definidas de agregados amorfos e precipitados não-estruturados. As fibras foram diluídas 1:10 e diretamente acopladas a um "Pioneer Sensor Chip F1" conforme descrito no Manual de Instrução do fabricante (BIApplication Handbook, versão AB, Biacore AB, Uppsala, 1998). Em experimentos iniciais, foi constatado que Fabs MS-Roche selecionados diferiam substancialmente em sua cinética de reação e desse modo o modo de análise de dados tinha que ser escolhido apropriadamente. Para ligantes com cinética lenta valores K_D foram calculados através de ajuste de curva de respostas de sensor dependentes do tempo, isto é, a partir da razão de $K_{ligado}/K_{desligado}$. Os

ligantes com cinética mais rápida foram analisados através de ajuste das respostas de sensor dependentes da concentração em equilíbrio (adsorção-isoterma). Os valores K_D foram calculados a partir de sensogramas Biacore com base na concentração de Fab total conforme determinado através de um ensaio de proteína. Para os clones derivados do 1º e do 2º ciclo de maturação de afinidade o conteúdo do Fab ativo em cada preparação foi determinado no Biacore de acordo com um método descrito por Christensen, *Analytical Biochemistry* (1997) 249, 153-164. Em resumo, ligação de proteína dependente do tempo a fibras de A β 1-40 imobilizada no chip Biacore foi medida durante a fase de associação sob condições limitadas de massa em taxas de fluxo diferentes da solução analisada. As condições de limitação de massa foram conseguidas imobilizando altas quantidades de fibras de A β (2300 unidades de resposta) na superfície do chip de um canal de medição e trabalhando em concentrações de analisado relativamente baixas, isto é, 160 nM (com base na concentração de proteína Fab total). Um sumário dos valores K_D de clones de MS-Roche selecionados identificados na avaliação principal da biblioteca HuCAL e seus derivados amadurecidos correspondentes após o 1º e o 2º ciclo de maturação de afinidade é mostrado na Tabela 3. No primeiro ciclo de maturação de afinidade a CDR3 de cadeia pesada (VH-CDR3) foi mantida constante e otimização foi focada sob a diversificação da CDR de cadeia leve (VL-CDR3). No 2º ciclo de afinidade diversificação de VL-CDR1 e VH-CDR2 foi realizada. Alguns dos ligantes do 1ª ciclo de maturação foram convertidos em anticorpos IgG1 humanos de comprimento completo de acordo com a tecnologia desenvolvida por MorphoSys conforme descrito no Exemplo 6 e valores K_D determinados no Biacore conforme acima descrito. Os valores K_D para IgG1 de comprimento completo ligando a fibras de A β 1-40 e A β 11-42 são mostrados na Tabela 4.

[00166] Derivados maduros de ambas L-CDR1 bem como biblioteca

de H-CDR2 após o 2º ciclo de maturação foram identificados e permitiram a combinação de cadeias leves e pesadas. A estratégia de clonagem cruzada é descrita no Exemplo 13. Ou cadeias leves integrais, LCDR1 ou L-CDR1+2 foram trocadas. Valores K_D de Fabs clonados de forma cruzada selecionados são mostrados na Tabela 8. Alguns dos Fabs dos 1º e 2º ciclos de maturação e dos ligantes clonados de forma cruzada foram convertidos em anticorpos IgG1 humanos de comprimento completo de acordo com a tecnologia desenvolvida pela MorphoSys conforme descrito no Exemplo 6. Valores K_D de IgG se ligando a fibras de A β 1-40 e A β 1-42 foram determinados no Biacore. Em resumo, um modelo cinético para a formação em etapas de um complexo bivalente foi usado, e valores K_D foram calculados através de análise do tipo Scatchard de ligação de equilíbrio. Devido ao processo de associação muito lento em concentração de anticorpo baixa (várias horas para atingir equilíbrio) dados de ligação de equilíbrio foram obtidos através de extrapolação das curvas de associação para intervalos de tempo longos. As taxas de liga e desliga para a formação do complexo monovalente e bivalente foram determinadas através dos procedimentos de ajuste de curva e usadas para a extrapolação. Com base nesses valores R_{eq} uma análise Scatchard foi realizada e os valores K_D para a formação do complexo monovalente e bivalente foram determinados. Os dados são resumidos na Tabela 5. A partir do gráfico Scatchard curvilíneo uma interação mais alta (bivalente) e mais baixa (monovalente) era derivada para os IgGs MS-R derivados do 2º ciclo de maturação de afinidade e clones cruzados. Essas duas afinidades representam os valores K_D inferiores e superiores da faixa indicada na

Tabela 5.

<i>Clones secretados de</i>	MS-R No.	K _D Aβ1-40	K _D Aβ1-42	MS-R No.	K _D Aβ1-40	K _D Aβ1-42	MS-R No.	K _D Aβ1-40	K _D Aβ1-42
		<i>nM</i>	<i>nM</i>		<i>nM</i>	<i>nM</i>		<i>nM</i>	<i>nM</i>
<i>Avaliação primária</i>	3	930	1300	7	1100	1714	8	850	1000
<i>1ª maturação de afinidade</i>	3,2	52	240	7,2	22	58	8,1	24	42
	3,3	38	104	7,3	23	88	8,2	24	64
	3,4	32	103	7,4	28	103			
	3,6	40	68	7,9	31	93			
				7,11	22	74			
				7,12	28	60			
<i>2ª maturação de afinidade</i>	3,2H1	4,4	3,3	7,2H1	9,3	10,2	8,1H1	13,6	9,2
	3,2H2	5,2	1,1	7,2H2	8,2	8,2	8,2H1	1,6 ^a	2,1 ^a
	3,3H1	17,1	19,4	7,2H3	45,4	5,3	8,2H3	n.d.	3,1
	3,3H2	10,6	22,8	7,2H4	5,9	5,0	8,2H4	12,1	11,9
	3,3H3	1,4	3,3	7,2H5	8,0	10,1	8,2L1	4,8	3,7
	3,4H1	13,5	14,0	7,2H6	1,0	n.d.			
	3,4H3	6,7	8,4	7,2H7	15,5	8,1			

Tabela 5. (Continuação)

Clones secretados de	MS-R No.	K_D A β 1-40	K_D A β 1-42	MS-R No.	K_D A β 1-40	K_D A β 1-42	MS-R No.	K_D A β 1-40	K_D A β 1-42
		<i>nM</i>	<i>nM</i>		<i>nM</i>	<i>nM</i>		<i>nM</i>	<i>nM</i>
	3,4H4	33,0	43,0	7,2H8	1,5	2,1			
	3,4H5	26,5	36,0	7,2L1	13,3	12,7			
	3,4H6	49,0	60,0	7,2L2	5,6	4,0			
	3,4H7	19,2	31,7	7,2L4	1,1	1,1			
	3,4H8	10,7	26,5	7,3H1	8,0	11,2			
	3,4H9	21,7	18,6	7,3L1	4,5	6,0			
	3,4H10	8,1	10,1	7,4H1	8,0	6,6			
	3,4H11	19,5	8,3	7,4H2	9,9	6,2			
	3,4H12	25,5	27,0	7,9H1	4,9	5,4			
	3,4H13	32,3	18,8	7,9H2	5,0	5,7			
	3,4H14	13,3	16,8	7,9H3	4,2	2,8			
	3,4H16	25,5	15,6	7,9H4	4,8	4,2			
	3,4H17	2,0	4,3	7,9H5	1,7	1,8			
	3,4H18	17,1	10,0	7,9H6	1,2	1,2			
	3,4L7	9,3	9,3	7,9H7	1,0	0,9			
	3,4L8	6,2	13,0	7,9H8	0,8	0,7			

Tabela 5. (Continuação)

Clones secretados de	MS-R No.	K _D Aβ1-40	K _D Aβ1-42	MS-R No.	K _D Aβ1-40	K _D Aβ1-42	MS-R No.	K _D Aβ1-40	K _D Aβ1-42
		<i>nM</i>	<i>nM</i>		<i>nM</i>	<i>nM</i>		<i>nM</i>	<i>nM</i>
	3,4L9	16,3	9,1	7,9H9	0,9	0,9			
	3,4L11	5,3	2,6	7,9L1	1,0	1,1			
	3,6H1	18,9	23,1	7,9L2	1,0	0,5			
	3,6H2	19,8	54,0	7,11H1	12,7	6,7			
	3,6H3	5,4	7,5	7,11H2	0,3	0,3			
	3,6H4	13,0	7,8	7,11H3	6,6	4,4			
	3,6H5	8,2	6,0	7,11H4	1,0	1,7			
	3,6H6	36,0	11,8	7,11H5	3,4	1,7			
	3,6H8	2,5	2,5	7,11L1	1,1	1,2			
	3,6L1	15,6	11,1	7,12H1	0,6	0,8			
	3,6L2	13,7	13,1	7,12L1	n.d.	3,8			
				7,12L2	4,0	5,4			
				7,12L3	0,8	0,9			
				7,12L4	2,0	0,6			
				7,12L5	0,8	0,6			
				7,12L6	n.d.	n.d.			
				7,12L7	n.d.	n.d.			

Tabela 3

Tabela 3: Valores K_D para Fab MS-R se ligando a fibras de A β 1-40 e A β 1-42 conforme determinado no Biacore. Para os clones derivados do 1º e do 2º ciclo de maturação de afinidade os valores são corrigidos para o conteúdo de Fab ativo presente em cada amostra conforme descrito no texto. ^a, os valores foram calculados a partir das respostas do sensor dependentes da concentração em equilíbrio, n.d., não-determinado.

Tabela 4:

MS-R No.	K_D A β 1-40	K_D A β 1-42
	<i>nM</i>	<i>nM</i>
3.3 IgG1	3,7	6,6
7,11 IgG1	2,2	5,7
7,12 IgG1	3,1	13,7
8,1 IgG1	6,6	12,3

Tabela 4: Valores K_D para IgG MS-R se ligando a fibras de A β 1-40 e A β 1-42 conforme determinado no Biacore. Os IgGs foram derivados de Fabs MS-R selecionados após o 1º ciclo de maturação de afinidade. Os valores são corrigidos para o conteúdo de IgGs MS-R ativos presentes em cada amostra conforme descrito no texto.

<i>Clones selecionados de 1ª maturação de afinidade</i>	MS-R IgGI	K_D A β 1-40	K_D A β 1-42
		<i>nM</i>	<i>nM</i>
	3.3	3,7	6,6
	7.11	2,3	5,7
	7.12	3,1	13,7
	8.1	6,6	12,3
<i>2ª maturação de afinidade</i>	3.4.H7	0,10- 0,30	0,10- 0,30
	7.2.H4	0,09- 0,30	0,10-0,66
	7.9.H2	0,12- 0,42	0,11-0,38
	7.9.H3	0,10-0,50	0,10-0,40
	7.9.H7	0,25- 0,69	0,24- 0,70

	7.12.L 1	1,20- 3,50	0,74-2,90
	8.2.H2	0,16-1,00	0,12-0,92
<i>Fabs clonados de forma cruzada</i>	3.6.H5x3.6.L2	0,20-1,03	0,20- 0,95
	3.6.H8x3.6.L2	0,22- 0,95	0,22- 0,82
	7.4. H2x7.2. L1	0,12- 0,63	0,12- 0,56
	7.11.H1x7.2.L1	0,14-0,66	0,15-0,67
	7.11.H1x7.11.L1	0,11-0,70	0,13-0,70

Tabela 5: Valores K_D para IgG1 MS-R se ligando a fibras de A β 1-40 e A β 1-42 conforme determinado no Biacore. Os IgGs eram derivados de Fabs MS-R selecionados após o 1^o e o 2^o ciclo de maturação de afinidade e de Fabs clonados de forma cruzada. Os valores são corrigidos para o conteúdo de IgGs MS-R ativos presentes em cada amostra conforme descrito no texto. Os dois valores K_D dados para IgGs MS-R derivados da 2^a etapa de maturação de afinidade e ligantes clonados de forma cruzada representam interação de afinidade superior e inferior conforme calculado a partir dos gráficos Scatchard. Com um número adicional de IgGs MS-R (por exemplo, IgG MS-R 7.9H2x7.12.L12 e IgG MS-R 7.9H4x7.12.L2), gráficos Scatchard curvilíneos complexos foram obtidos e determinação dos valores K_D não foi então possível.

Exemplo 9: Tingimento de placas amiloide humanas genuínas em seções cerebrais de um paciente de Doença de Alzheimer através de imunofluorescência indireta

[00167] Fabs MS-Roche e IgG1 de comprimento completo selecionados foram testados quanto à ligação a placas β -amiloide através de análise imunohistoquímica. Seções criostáticas de tecido não-fixado do córtex temporal humano (obtido pós-morte de um paciente que era positivamente diagnosticado para doença de Alzheimer) foram marcadas através de imunofluorescência indireta usando anticorpos Fabs MS-Roche e IgG1 humano de comprimento completo em várias concentrações. Anticorpos Fabs e IgG1 foram

revelados através de fragmento F(ab')₂ purificado com afinidade anti-humano de cabra conjugado a Cy3 e (H+L) anti-humano de cabra conjugado a Cy3, respectivamente. Ambos reagentes secundários foram obtidos da Jackson Immuno Research. Os controles incluíam um Fab não-relacionado e os anticorpos secundários sozinhos, todos os quais deram resultados negativos. Exemplos típicos de tingimentos de placa com anticorpos Fabs MS-Roche e IgG1 MS-Roche são mostrados nas Figuras 5 a 7.

Exemplo 10: Ensaio de Polimerização: Prevenção de agregação de A β

[00168] A β sintético quando incubado em tampão aquoso durante vários dias espontaneamente agrega e forma estruturas fibrilares que são similares àquelas vistas em depósitos de amiloide nos cérebros de pacientes com Doença de Alzheimer. Foi desenvolvido um ensaio *in vitro* para medir a incorporação de A β biotilado em agregados de A β afim de analisar o potencial de neutralização de A β de anticorpos anti-A β e outras proteínas de ligação de A β tal como albumina (Bohrmann e outros, 1999, *J. Biol. Chem.* 274, 15990-15995). O efeito de moléculas pequenas sobre a agregação de A β pode ser também analisado neste ensaio.

Procedimento experimental:

[00169] Placas de microtitulação Maxisorb NUNC (MTP) são revestidas com uma mistura 1:1 de A β 1-40 e A β 1-42 (2 μ M cada, 100 μ l por cavidade) a 37° C por três dias. Sob essas condições altamente agregadas, A β fibrilar é adsorvido e imobilizado na superfície da cavidade. A solução de revestimento é então removida e as placas são secas em temperatura ambiente por 2-4 horas. (As placas secas podem ser armazenadas a -20° C). Locais de ligação residuais são bloqueados adicionando 300 μ l/cavidade de solução salina tamponada com fosfato contendo 0,05% de Tween 20 (T-PBS) e 1% de albumina

de soro bovino (BSA). Após 1-2 horas de incubação em temperatura ambiente as placas são lavadas 1x com 300 μ l de T-PBS. Uma solução de 20 nM de A β 1-40 biotilado em 20 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl pH 7,2 (TBS) contendo 0,05% de NaN₃ e anticorpo serialmente diluído é adicionada (100 μ l/cavidade) e a placa incubada a 37° C da noite para o dia. Após lavagem 3x com 300 μ l de T-PBS um conjugado de estreptavidina-POD (Roche Molecular Biochemicals), diluído 1:1000 em T-PBS contendo BSA a 1%, é adicionado (100 μ l/cavidade) e incubado em temperatura ambiente por 2 horas. As cavidades são lavadas 3x com T-PBS e 100 μ l/cavidade de uma solução de tetrametil-benzidina recém-preparada (TMB) são adicionados. [Preparação da solução de TMB: 10 ml de ácido cítrico 30 mM pH 4,1 (ajustada com KOH) + 0,5 ml de TMB (12 mg de TMB em 1 ml de acetona + 9 ml de metanol) + 0,01 ml de H₂O₂ a 35%]. A reação é parada adicionando 100 μ l/cavidade de H₂SO₄ 1N e a absorbância é lida a 450 nm em uma leitora de placa de microtitulação.

Resultado:

[00170] A Figura 8 mostra que anticorpos IgG1 MS-Roche previnem a incorporação de A β 1-40 biotilado a agregados de A β 1-40/A β 1-42 pré-formados. A capacidade de neutralização de A β desses IgGs humanos de comprimento completo era similar àquela do anticorpo monoclonal de camundongo BAP-1, que foi gerado através de um procedimento de imunização padrão e especificamente reconhece resíduos de aminoácido 4-6 do peptídeo A β quando analisado através da técnica "Pepspot" conforme descrito no Exemplo 7. Anticorpo monoclonal de camundongo BAP-2 que também reage exclusivamente com aminoácidos 4-6 (Brockhaus, não publicado) era significativamente menos ativo neste ensaio. Uma atividade ainda menor foi verificada com o anticorpo BAP-17 específico C-terminal de

A β 1-40 (Brockhaus, Neuroreport 9 (1998), 1481-1486) e o anticorpo monoclonal 4G8 que reconhece um epítipo entre as posições 17 e 24 na sequência de A β (Kim, 1988, *Neuroscience Research Communication*, Vol. 2, 121-130). BSA em uma concentração de até 10 μ g/ml não afetou a incorporação de A β biotinilado e serviu como um controle negativo. No entanto, em concentrações mais altas, isto é, >100 μ g/ml, BSA foi descrita inibir a ligação de A β biotinilado em fibras de A β pré-formado (Bohrmann (1999) *J. Biol. Chem.* 274 (23), 15990-5) indicando que a interação de BSA com A β não é de alta afinidade.

Exemplo 11: Ensaio de Despolimerização: Liberação de A β biotinilado de A β agregado

[00171] Em um ajuste experimental similar foi testado o potencial de anticorpos de IgG MS-Roche em induzir despolimerização de A β agregado. A β 1-40 biotinilado foi primeiro incorporado a A β 1-40/A β 1-42 pré-formado antes de tratamento com vários anticorpos anti-A β . Liberação de A β biotinilado foi medida usando o mesmo ensaio conforme descrito no ensaio de polimerização.

Procedimento experimental:

[00172] Placas de microtitulação Maxisorb NUNC (MTP) são revestidas com uma mistura 1:1 de A β 1-40 e A β 1-42 conforme descrito no ensaio de polimerização. Para incorporação de A β biotinilado as placas revestidas são incubadas com 200 μ l/cavidade de 20 nM de A β 1-40 biotinilado em TBS contendo 0,5% de NaN₃ a 37° C da noite para o dia. Após lavagem da placa com 3 x 300 μ l/cavidade de T-PBS, os anticorpos serialmente diluídos em TBS contendo 0,05% de NaN₃ foram adicionados e incubados a 37° C por 3 horas. A placa foi lavada e analisada quanto à presença de A β 1-40 biotinilado conforme acima descrito.

Resultado:

[00173] As Figuras 9A a D mostram que os anticorpos da invenção

induzem despolimerização de A β agregado conforme medido através da liberação de A β 1-40 biotinilado incorporado. Os anticorpos MS-R e o anticorpo monoclonal de camundongo BAP-1 eram similarmente ativos enquanto que anticorpos BAP-2, BAP-17 e 4G8 eram claramente menos eficientes na liberação de A β biotinilado da massa de agregados de A β imobilizados. BAP-1 pode ser claramente diferenciado de anticorpos MS-R pela sua reatividade com APP de comprimento completo da superfície celular (vide Figura 15) e anticorpos tal como BAP-1 com propriedades que não são úteis para aplicações terapêuticas como reações autoimunológicas potenciais podem ser induzidos. É interessante notar que BAP-2, apesar de sua especificidade para resíduo de aminoácido 4-6 que é exposto em A β agregado, tem uma atividade claramente menor neste ensaio indicando que nem todos os anticorpos N-terminais específicos a priori são igualmente eficientes na liberação de A β a partir de agregados pré-formados. Os IgGs MS-Roche são claramente superiores a BAP-2 com relação à atividade de despolimerização. A eficiência relativamente baixa de BAP-17 (específico C-terminal) e 4G8 (específico de resíduos de aminoácido 16-24) neste ensaio é devido à natureza crítica desses dois epitopos em A β agregado. Como já notado no ensaio de polimerização, BSA nas concentrações usadas aqui não tinha nenhum efeito sobre A β agregado.

[00174] Os anticorpos MS-R derivados do 2º ciclo de maturação de afinidade e de ligantes clonados de forma cruzada mostram em geral uma eficácia maior no ensaio de despolimerização (comparação da Figura 9A com as Figuras 9B e C), que está de acordo com a afinidade de ligação maior desses anticorpos (vide Tabelas 3-5). Os anticorpos monoclonais AMY-33 e 6F/3D foram descritos prevenir a agregação de A β *in vitro* sob certas condições experimentais (Solomon (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 452-455; anticorpos AMY-33 e 6F/3D foram

obtidos da Zymed Laboratories Inc., São Francisco (No. de ordem 13-0100) e Dako Diagnostics AG, Zug, Suíça (No. de ordem M087201), respectivamente). Conforme demonstrado na Figura 9D, ambos anticorpos eram completamente inativos no ensaio de despolimerização.

Exemplo 12: Análise de epitopo através de ELISA em conjugados de peptídeo

[00175] Os heptapeptídeos que seguem (código de letra única) foram obtidos através de síntese de fase sólida e purificados através de cromatografia líquida usando as técnicas conhecidas na técnica.

AEFRHDC
EFRHDSC
FRHDSGC
RHDSGYC
HDSGYEC
DSGYEVC
SGYEVHC
YEVHHQC
EVHHQKC
VHHQKLC
HHQKLVC
HQKLVFC
QKLVFFC
KLVFFAC
LVFFAEC
VFFAEDC
FFAEDVC
FAEDVGC
AEDVGSC
EDVGSNC

DVGSNKC

VGSNKGC

GSNKGAC

CSNKGAI

CNKGAI

CKGAIIG

CGLMVGG

CMVGGVV

CGGVVIA

[00176] Os peptídeos foram dissolvidos em DMSO para chegar a 10 mM de concentração.

[00177] Albumina bovina (essencialmente BSA livre de ácido graxo, Sigma Lot 112F-9390) foi dissolvida para 10 mg/ml em bicarbonato de sódio 0,1M e ativada através de adição por ml de 50 µl de 26 mg/ml de uma solução de propionato de N-succinimidil-maleinimido (NSMP, Pierce) em DMSO. Após 15 minutos de reação em temperatura ambiente a BSA ativada foi purificada através de filtragem em gel (NAP-10, Pharmacia) em PBS com 0,1% de azida de sódio como solvente. 50 µl de BSA ativada com NSMP (6,7 mg/ml) foram diluídos com 50 µl de PBS, 0,1% de azida de sódio e 10 µl de solução de peptídeo (1 mM em DMSO) foram adicionados. Como controle negativo BSA ativada foi tratada com simulação com adição de peptídeo. Após 4 horas em temperatura ambiente a reação foi parada através da adição de 10 µl de 10 mM de Cisteína. Uma alíquota da mistura de reação conjugada foi diluída 1:100 com 0,1M de tampão de bicarbonato de sódio e imediatamente enchida nas cavidades (100 µl) de placas ELISA (Nunc Immuno-Plate). Após descansar por 16 horas a 4° C, 100 µl de tampão de bloqueio (como acima) foram adicionados a cada cavidade e incubados por mais 30 minutos. As placas foram lavadas com 2x300 µl/cavidade de TBST (como acima) e enchidas

com 100 μ l de anticorpo a 10 μ g/ml ou 2 μ g/ml em tampão de bloqueio. As placas foram mantidas 16 horas a 4° C e lavadas com 2x300 μ l de TBST. 100 μ l/cavidade de H+L Ig anti-humano conjugado com HRP (Pierce, diluição 1:1000 com tampão de bloqueio) foram adicionados e incubados por 1 hora em temperatura ambiente. As placas foram lavadas com 3x300 μ l/cavidade de TBST. Desenvolvimento de cor foi iniciado através da adição de 100 μ l de reagente de tetrametil benzidina/peróxido de hidrogênio. A reação foi parada após 5 minutos com a adição de 100 μ l/cavidade de ácido sulfúrico 1M e a densidade óptica é medida através de um leitor óptico (Microplate Reader 3550, BioRad) a 450 nM. Para comparação anticorpos monoclonais de camundongo foram analisados da mesma maneira, exceto usando como agente de revelação Ig anti-camundongo marcado com HRP ao invés de Ig anti-humano.

[00178] Empregando específicos dos heptapeptídeos descritos acima derivados de A β , testes ELISA específicos conforme aqui descrito foram realizados. De preferência, os anticorpos da invenção compreendem anticorpos que mostram, conforme medido através de densidades ópticas, um sinal para razão de base acima de "10" quando sua reatividade com um peptídeo derivado de A-beta (AEFRHD; aminoácidos 2 a 7 de A-beta) é comparada com uma proteína/peptídeo não-relacionada tal como BSA. Com mais preferência, a razão de densidades ópticas é acima de "5" para uma reação correspondente com pelo menos um dos três peptídeos derivados de A β que seguem: (VFFAED; aminoácidos 18 a 23 de A β) ou (FFAEDV; aminoácidos 19 a 24 de A β) ou (LVFFAE; Aminoácidos 17 a 22 de A β). Resultados correspondentes para os anticorpos de origem e/ou amadurecidos da invenção são mostrados nas duas tabelas que seguem:

MS-R No.	Peptídeo 2- 7 2-7/BSA	Peptídeo 17-22 17-22/BSA	Peptídeo 18-23 18-23/BSA	Peptídeo 19-24 19-24/BSA	Razão de peptídeo 17-22/2-7	Razão de peptídeo 18-23/2-7	Razão de peptídeo 19-24/2-7
7	24	4	7	4	0,17	0,29	0,17
8	28	10	29	25	0,36	1,04	0,89
7.2	34	12	16	9	0,35	0,47	0,26
7.3	34	11	15	9	0,32	0,44	0,26
7.4	36	10	13	6	0,28	0,36	0,17
7.9	28	9	13	8	0,32	0,46	0,29
7.11	37	11	15	9	0,30	0,41	0,24
7.12	38	6	8	7	0,16	0,21	0,18
8.1	30	1	11	8	0,03	0,37	0,27
8.2	32	4	28	23	0,13	0,88	0,72
3.2H2	26	12	23	20	0,46	0,88	0,77
3.3HI	23	4	12	8	0,17	0,52	0,35
3.3H3	31	2	5	2	0,06	0,16	0,06
3.4HI	27	2	8	2	0,07	0,30	0,07
3.4H2	16	11	1	1	0,69	0,06	0,06
3.4H3	22	9	17	11	0,41	0,77	0,50
3.4H5	28	5	13	4	0,18	0,46	0,14

MS-R No.	Peptídeo 2- 7 2-7/BSA	Peptídeo 17-22 17-22/BSA	Peptídeo 18-23 18-23/BSA	Peptídeo 19-24 19-24/BSA	Razão de peptídeo 17-22/2-7	Razão de peptídeo 18-23/2-7	Razão de peptídeo 19-24/2-7
3.4H7	24	2	6	5	0,08	0,25	0,21
3.4H17	28	5	12	11	0,18	0,3	0,39
3.4L11	31	6	20	5	0,19	0,65	0,16
3.6H6	25	1	4	7	0,04	0,16	0,28
3.6H1	23	3	13	5	0,13	0,57	0,22
3.6H2	19	2	8	3	0,11	0,42	0,16
7.2HI	38	8	11	9	0,21	0,29	0,24
7.2H2	16	10	10	10	0,63	0,63	0,63
7.2H3	33	17	20	18	0,52	0,61	0,55
7.2H4	23	12	13	12	0,52	0,57	0,52
7.2H5	30	13	18	15	0,43	0,60	0,50
7.2L1	24	14	16	11	0,57	0,68	0,45
7.4H1	31	16	20	16	0,52	0,65	0,51
7AH2	36	17	20	16	0,47	0,56	0,46
7.9HI	32	7	12	6	0,23	0,36	0,19
7.9H2	35	3	6	8	0,08	0,16	0,23
7.9H3	35	11	20	9	0,31	0,57	0,27

MS-R No.	Peptídeo 2- 7	Peptídeo 17-22	Peptídeo 18-23	Peptídeo 19-24	Razão de peptídeo	Razão de peptídeo	Razão de peptídeo
	2-7/BSA	17-22/BSA	18-23/BSA	19-24/BSA	17-22/2-7	18-23/2-7	19-24/2-7
7.9H4	30	10	15	7	0,32	0,49	0,22
7.11HI	31	8	9	8	0,25	0,29	0,25
7.11H2	34	10	12	14	0,29	0,36	0,41
7.12L1	16	10	12	10	0,60	0,70	0,59
8.1H1	29	22	25	25	0,77	0,88	0,86
8.2H1	22	7	23	20	0,34	1,05	0,94
8.2L1	26	15	32	31	0,60	1,26	1,22

Tabela 6: Reatividade de Fabs MS-R com heptapeptídeos A-beta 2-7 conjugados com BSA (AEFRHD), 17-22 (LVFFAE), 18-23 (VFFAED) e 19-24 (FFAEDV). As razões da leitura de ELISA (densidade óptica) obtidas com BSA conjugada com peptídeo e não-conjugada com peptídeo são dadas. As intensidades de sinal obtidas com os peptídeos 17-22, 18-23 e 19-24 em relação ao peptídeo 2-7 são também indicadas.

MS-R IgG	AEFRHD	LVFFAE	VFFAED	FFAEDV	Razão de peptídeo	Razão de peptídeo	Razão de peptídeo
No.	2-7/BSA	17-22/BSA	18-23/BSA	19-24/BSA	17-22/2-7	18-23/2-7	19-24/2-7
3.3	17	11	16	11	0,65	0,94	0,65
7.12	19	11	13	11	0,58	0,68	0,58
8.1	16	7	16	14	0,44	1,00	0,88
3.4H7	22	3	16	15	0,14	0,73	0,68
7.9H2	13	5	8	6	0,38	0,62	0,46
7.9H3	13	6	8	6	0,46	0,62	0,46
7.9.H7	30	5	16	10	0,17	0,53	0,33
7.11H2	10	6	7	6	0,60	0,70	0,60
8.2.H2	18	10	15	14	0,56	0,83	0,78
3.6.H5x3.6.L 2	11	7	9	8	0,64	0,82	0,73
7.11.H2x7.9. L 1 (L1)	14	8	10	9	0,57	0,71	0,64
8.2.H2x8.2.L 1	13	20	25	25	1,54	1,92	1,92
<i>Mab de camundongo</i>							
BAP-1	21	1	1	1	0,05	0,05	0,05
BAP-2	21	1	1	1	0,05	0,05	0,05
4G8	1	23	20	1	23	20	1
6E10	18	1	1	1	0,06	0,06	0,06
6F/3D*	1	1	1	1	1	1	1
Amy 33.	16	2	1	1	0,13	0,06	0,19

Tabela 7: Reatividade de IgGs MS-R e anticorpos monoclonais de

camundongo BAP-1, BAP-2, 4G8, 6E10 Amy-33 e 6F/3D com heptapeptídeos A β conjugados com BSA 2-7 (AEFRHD), 17-22 (LVFFAE), 18-23 VFFAED) e 19-24 (FFAEDV). As razões da leitura de ELISA (densidade óptica) obtidas com BSA conjugada com peptídeo e não-conjugada com peptídeo são dadas. As intensidades de sinal obtidas com os peptídeos 17-22, 18-23 e 19-24 em relação ao peptídeo 2-7 são também indicadas. * Este anticorpo é específico para a sequência 8-17 e não reconhece sequências de epítipo N-terminais ou médias.

Exemplo 13: Combinação de H-CDR2 e L-CDR1 otimizadas através de clonagem com cruzamento

[00179] O desenho modular da biblioteca HuCAL permite troca de regiões de determinação de complementariedade (CDRs) de dois genes codificando Fab diferentes em uma única etapa de clonagem. Para mais uma melhora da afinidade a H-CDR2 e a L-CDR1 independentemente otimizadas de clones maduros com a mesma H-CDR3 foram combinadas, porque havia uma alta probabilidade de que esta combinação levasse a um ganho maior de afinidade (Yang e outros, 1995, *J. Mol. Biol.* 254, 392-403; Schier e outros, 1996b, *J. Mol. Biol.* 263, 551-567; Chen e outros, 1999, *J. Mol. Biol.* 293, 865-881). Cadeias leves inteiras, ou seus fragmentos, foram transferidas de um clone doador otimizado de L-CDR1 para um clone recipiente otimizado de H-CDR2. Clones doador e recipiente foram apenas combinados, se ambos carregassem sequências de H-CDR3 idênticas. Todos os clones doador e recipiente carregavam a estrutura principal VH3-V κ 3.

[00180] Isso foi realizado através de transferência de cadeias leves completas do clone doador otimizado de L-CDR1 para o clone recipiente otimizado de H-CDR2. Especificidade de epítipo foi conservada apenas combinando clones com a mesma H-CDR3. Através de troca de cadeia leve um clone otimizado de H-CDR2 obtido apenas através de uma L-CDR1 otimizada, se a troca aconteceu entre os clones com a mesma L-

CDR3. Se a L-CDR3 dos clones a serem combinados fosse diferente, o clone otimizado com H-CDR2 adquiriria em adição à L-CDR1 otimizada uma outra L-CDR3 (L-CDR2 permaneceu na sequência de consenso HuCAL (Knappik e outros, 2000)) e quando derivados de MS-Roche No. 7.12 foram usados como doadores da cadeia leve L-CDR 1, 2 e 3 foram trocadas no clone aceitador otimizado com H-CDR2. Três estratégias de clonagem diferentes foram empregadas:

1) Usando endonucleases de restrição XbaI e SphI o fragmento da cadeia leve de anticorpo completa foi excisado do plasmídeo 1 (por exemplo, pMx9_Fab_MS-Roche No.7.11.H1_FS) e a parte traseira do vetor desse modo obtido foi então ligada ao fragmento de cadeia leve do plasmídeo 2 (por exemplo, pMx9_Fab_MS-Roche No.7.2.L1_FS) gerado pela digestão de XbaI e SphI. Desse modo um novo plasmídeo (nomenclatura: pMx9_Fab_MS-Roche No.7.11.H1x7,2.L1_FS) foi criado codificando L-CDR 1, 2, 3 do clone de origem No.7.2.L1 e H-CDR 1, 2, 3 do clone de origem No.7.11.H1.

2) Usando endonucleases de restrição XbaI e Acc65I um fragmento codificando L-CDR1 foi excisado do plasmídeo 1 (por exemplo, pMx9_Fab_MS-RocheNo.7.11.H2_FS) e a parte traseira do vetor desse modo obtido foi então ligada ao fragmento de L-CDR1 do plasmídeo 2 (por exemplo, pMx9_Fab_MS-Roche No.7.12.L1_FS) gerado pela digestão de XbaI e Acc65I. Desse modo um novo plasmídeo (nomenclatura: pMx9_Fab_MS-Roche No.7.11.H2x7,2.L1 (L-CDR1)_FS) foi criado codificando L-CDR 1, de clone de origem nº 7.12.L1 enquanto que L-CDR2,3 e H-CDR1, 2, 3 são derivadas do clone de origem No.7.11.H2.

3) Usando endonucleases de restrição XbaI e BamHI um fragmento codificando L-CDR1 e L-CDR2 foi excisado do plasmídeo 1 (por exemplo, pMx9_Fab_MS-Roche No.7.11.H2_FS) e a parte

traseira do vetor desse modo obtido foi então ligada ao fragmento de L-CDR1 e L-CDR2 do plasmídeo 2 (por exemplo, pMx9_Fab_MS-Roche No.7.12.L1_FS) gerado pela digestão de XbaI e BamHI. Desse modo um novo plasmídeo (nomenclatura: pMx9_Fab_MS-Roche No.7.11.H2x7.12.L1 (L-CDR1+2)_FS) foi criado codificando L-CDR1 e L-CDR2 do clone de origem No.7.12.L1 enquanto que L-CDR3 e H-CDR 1, 2, 3 são derivadas do clone de origem No.7.11.H2.

[00181] Exemplos ilustrativos das estratégias de clonagem diferentes bem como para clones doador e recipiente de sequência são dados na Tabela 8.

[00182] Após expressão e purificação em grande escala suas afinidades foram determinadas em fibras de A β (1-40). Ainda, valores K_D para Fab MS-R/anticorpos clonados de forma cruzada são dados na Tabela 9 anexa.

Nome do ligante	L-CDR1	pos.49	L-CDR2	pos.85	L-CDR3	H-CDR1	pos.47	H-CDR2	H-CDR3
-----------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

Estratégia de clonagem 1) ↓

↓

MS-Roche No.7.11.Ha	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRA T	T	QQVYSP PH	GFTFSSY AMS	W	GINAAGFRITYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche No.7.2.L1	RASQYVDRTYLA	Y	GASSRA T	T	QQIYSFP H	GFTFSSY AMS	W	AISGSGGSTYY ADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche No.7.11.H1x7.2.L1	RASQYVDRTYLA	Y	GASSRA T	T	QQIYSFP H	GFTFSSY AMS	W	GINAAGFRITYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYF DV

Estratégia de clonagem 2) ↓

↓

MS-Roche No.7.11.H2	RASQSVSSSYL A	Y	GASSRA T	T	QQVYSP H	GFTFSSY AMS	W	AINANGYKKYYADSVK G	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche No.7.12.L1	RASQYVFRRYL A	S	GSSNRA T	V	LQL YNIPN	GFTFSSYGM S	W	NISGSGSSTYYADSVK G	GKGNTHKPYGYVRYF DV
MS-Roche No.7.11.H2x7.12.U(LCDR 1)	RASQYVFRRYL A	Y	GASSRA T	T	QQVYSP H	GFTFSSY AMS	W	AINANGYKKYYADSVK G	GKGNTHKPYGYVRYF DV

117/130

Estratégia de clonagem 3) ↓

↓

MS-Roche No.7.11.H2	RASQSVSSSY LA	Y	GASSRA T	T	QQVYSP H	GFTFSSYAM S	W	AINANGYKKYY ADSVKG	GKGNTHKPYGYVRY FDV
MS-Roche No.7.12.L1	RASQYVFRRY LA	S	GSSNRA T	V	LQL YNIPN	GFTFSSYG MS	W	NISGSGSSTYYADSV KG	GKGNTHKPYGYVRY FDV
MS-Roche No.7.11.H2x7.12.L1(LCD R1+2)	RASQYVFRR YLA	S	GSSNR AT	T	QQVYSP PH	GFTFSSYA MS	W	AINANGYKKYYADS VKG	GKGNTHKPYGYVR YFDV

Nome do ligante	L-CDR1	pos.49	L- CDR2	pos.8 5	L-CDR3	H-CDR1	pos.47	H-CDR2	H-CDR3
-----------------	--------	--------	------------	------------	--------	--------	--------	--------	--------

MS-Roche No.3.6H5	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYP	GFTFSSYAMS	W	AISESGKTKYYADSVKG	L THY ARYYRYFDV
MS-Roche No.3.6L2	RASQFLSRYVLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	L THY ARYYRYFDV
MS-Roche No.3.6H5x3.6L2	RASOFLSRYVLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYP	GFTFSSYAMS	W	AISESGKTKYYADSVKG	L THY ARYYRYFDV
MS-Roche No.3.6H8	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYP	GFTFSSYAMS	w	AISEYSKFKYYADSVKG	LTHYARYYRYFDV

118/130

MS-Roche No.3.6L2	RASQFLSRYVLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.3.6H8x3.6L2	RASQFLSRYVLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYP	GFTFSSYAMS	W	AISEYSKFKYYADSVKG	LTHYARYRYFDV
MS-Roche No.7.4.H2	" RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQIYNFPH	GFTFSSYAMS	W	AINYNGARIYY ADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche No.7.2.L1	RASQYVDRTYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYY ADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche No.7.4.H2x7.2.11	RASQYVDRTYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AINYNGARIYV ADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche No.7.9H2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	LQIYNMPI	GFTFSSYAMS	W	AINADGNRKYVADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche No.7.12L2	RASQRFFYKYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYGMS	W	NISGSGSSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche No.7.9H2x7.12L2	RASQRFFYKYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYAMS	W	AINADGN RKYY ADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche No.7.9H4	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	LQIYNMPI	GFSSY AMS	W	AINA VGMKKFY ADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche No.7.12.L2	RASQRFFYKYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYGMS	W	NISGSGSSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV

MS-Roche No.7.9H4x7.12L2	RASQRFFYKYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYAMS	W	AINA VGM KKFY ADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche No.7.11HL	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSPPH	GFTFSSYAMS	W	GINAAGFRYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche No.7.11L1	RASQRILRIYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSPPH	GFTFSSY AMS	W	AISGSGGSTYY ADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
Nome do ligante	L-CDR1	pos.49	L-CDR2	Pos. 85	I-CDR3	H-CDR1	pos.47	H-CDR2	H-CDR3
MS-Roche No.7.11H1x7.11L1	RASQRILRIYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSPPH	GFIFSSY AMS	W	GINAAGFRYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche No.7.11H1	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSPPH	GFTFSSYAMS	W	GINAAGFRYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche No.7.2L1	RASQYVDRTYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche No.7.11H1x7.2L1	RASQYVDRTYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	GINAAGFRYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche No.3.3HL	RASOSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	HQMSSYPP	GFTFSSYAMS	W	WISEKSRFIYY ADSVKG	LTHYARYYRYFDV
MS-Roche No.3.4L9	RASRRIHVYYLA	Y	GASSRAT	T	QQTIDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	LTHYARYYRYFDV
MS-Roche No.3.3H1x3.4L9	RASRRIHWYLA	Y	GASSRAT	T	QQTIDYPP	GFTFSSYAMS	w	WISEKSRFIYY ADSVKG	LTHYARYYRYFDV
MS-Roche No.3.4HL	RASOSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQTIDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISETSIRKYY ADSVKG	LTHYARYYRYFDV

MS-Roche No.3.4L9	RASRRIHVYYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKGL	LTHYARYYRYFDV
MS-Roche No.3.4H1x3.4I9	RASRRIHWYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISSETSIRKYY ADSVKG	LTHYARYYRYFDV
MS-Roche No.3.4H3	RASOSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	VISOTGRKIYY ADSVKG	LTHYARYYRYFDV
MS-Roche No.3.4L7	RASORLGRL YLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYY ADSVKG	LTHY ARYYRYFDV
MS-Roche No.3.4H3x3.4L7	RASORLGRL YLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	VISQTGRKIvy ADSVKG	LTHYARYYRYFDV
MS-Roche No.3.4H3	RASOSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	VISOTGRKIYY ADSVKG	LTHY ARYYRYFDV
MS-Roche No.3.4L9	RASRRIHVYYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYY ADSVKG	LTHY ARYYRYFDV
MS-Roche No.3.4H3x3.4L9	RASRRIHVYYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	VISQTGRKIvy ADSVKG	LTHYARYYRYFDV
MS-Roche No.3.4H7	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	VISETGKNIYY ADSVKG	LTHYRYYRYFDV
MS-Roche No.3.4L9	RASRRIHVYYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKGL	LTHYARYYRYFDV
MS-Roche No.3.4H7x3.4L9	RASRRIHWYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	VISETGKNIVY ADSVKG	LTHYARYYRYFDV
MS-Roche No.3.4H7	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	VISETGKNIYYADSVKGL	LTHYARYYRYFDV

MS-Roche No.3.4L7	RASQRLGRLYLE	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYY ADSVKG	LTHYARYYRYFDV
Nome do ligante	L-CDR1	pos.49	L-CDR2	pos.85	L-CDR3	H-CDR1	pos.47	H-CDR2	H-CDR3
MS-Roche No.3.4H7x3.4L7	RASQRLGRLYLE	Y	GASSRAT	T	QQTYDYPP	GFTFSSYAMS	W	VISETGKNIYY ADSVKG	LTHYARYYRYFDV
MS-Roche No.3.6H5	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYPP	GFTFSSY AMS	W	AISESGKTKYY ADSVKG	LTHYARYYRYFDV
MS-Roche No.3.6L1	RASQFIQRFYLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYPP	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	LTHYARYYRYFDV
MS-Roche No.3.6H5x3.6L1	RASQFIQRFYLA	Y	GASSRAT	V	QQTYNYPP	GFTFSSY AMS	W	AISESGKTKYY ADSVKG	LTHYARYYRYFDV
MS-Roche No.7.2H2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AINGTGMKKYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche No.7.2L1	RASQYVDRTYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche No.7.2H2x7.2L1	RASQYVDRTYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	W	AINGTGMKKYY ADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche No.7.4H2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	V	QQIYNFPH	GFTFSSYAMS	W	AINYNGARIYY ADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche No.7.12L2	RASQRFFYKYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYGMS	W	NISGSGSSTYYADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV

122/130

MS-Roche No.7.4H2x7.12L2	RASQRFFYKYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSY AMS	WAINYNGARIYY	ADSVKGGKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche No.7.9H2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	LQIYNMPI	GFTFSSYAMS	WAINADGNRKYY	ADSVKGGKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche No.7.2L1	RASQYVDRTYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	WAINSGGGSTYY	ADSVKGGKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche No.7.9H2x7.2L1	RASQYVDRTYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	WAINADGNRKYY ADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche No.7.11H2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSPPH	GFTFSSYAMS	WAINANGYKKYY	ADSVKGGKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche No.7.2L1	RASQYVDRTYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	WAINSGGGSTYY ADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche No.7.11H2x7.2L1	RASQYVDRTYLA	Y	GASSRAT	T	QQIYSFPH	GFTFSSYAMS	WAINANGYKKYY	ADSVKGGKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche No.7.9H2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	LQIYNMPI	GFTFSSYAMS	WAINADGNRKYY	ADSVKGGKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche No.7.12L1	RASQYVFRRYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYGMS	WAINISGGSSTYY	ADSVKGGKGNTHKPYGYVRYFDV
MS-Roche No.7.9H2x7.12L1	RASQYVFRRYLA	S	GSSNRAT	V	LQLYNIPN	GFTFSSYAMS	WAINADGNRKYY ADSVKG	GKGNTHKPYGYVRYFDV

Nome do ligante	L-CDR1	pos.4 9	L-CDR2	Pos. .85	L-CDR3	H-CDRI	pOs.4 7	H-CDR2	H-CDR3
MS-Roche No.7.11H2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSPP H	GFTFSSYAMS	W	AINANGYKKYYADSVK G	GKGNTHKPYGYVRYFD V
MS-Roche No.7.9L1	RASQRLSPRYLA	Y	GASSRAT	T	LQIYNMPI	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYYADSVK G	GKGNTHKPYGYVRYFD V
MS-Roche No.7.11H2x7.9L1	RASQRLSPRYLA	Y	GASSRAT	T	LOIYNMPI	GFTFSSYAMS	W	AINANGYKKYYADSVK G	GKGNTHKPYGYVRYFD V
MS-Roche No.8.1H1	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	OOLSNYPP	GFTFSSYAMS	W	AISRSGSNIYYADSVKG	LLSRGYNGYYHKFDV
MS-Roche No.8.2L1	RASQRVSGRYL A	Y	GASSRAT	T	OQLSSY	GFTFSSYAMS	W	AISGSGGSTYY ADSVKG	LLSRGYNGYYHKFDV
MS-Roche No.8.1H1x8.2L1	RASQRVSGRYL A	Y	GASSRAT	T	QQLSSYPP	GFTFSSYAMS	W	AISRSGSNIYY ADSVKG	LLSRGYNGYYHKFDV
MS-Roche No.7.11H2	RASQSVSSSYLA	Y	GASSRAT	T	QQVYSPP H	GFTFSSYAMS	W	AINANGYKKYYADSVK G	GKGNTHKPYGYVRYFD V
MS-Roche No.7.12L1	RASQYVFRRYLA	S	GSSNRA T	V	LQL YNIPN	GFTFSSYGM S	W	NISGSGSSTYYADSVK G	GKGNTHKPYGYVRYFD V
MS-Roche No.7.11H2x7.12L 1	RASQYVFRRYLA	S	GSSNRA T	V	LQL YNIPN	GFTFSSYAMS	W	AINANGYKKYYADSVK G	GKGNTHKPYGYVRYFD V

Tabela 8 As setas indicam a localização dos locais de enzima de restrição usados para digerir os plasmídeos correspondentes.

MS-R NO.	K_D a β 1-40 <i>nM</i>	K_D a β 1-42 <i>nM</i>
	-	
3.3H1x3AL9	2,16	2,97
3AH1x3AL9	0,25	0,5
3AH3x3AL7	0,92	0,92
3AH3x3AL9	1,05	0,93
3,4H7x3AL9	2,66	3,51
3AH7x3AL7	1,19	1,23
3.6H5x3.6L1	1,25	1,04
3.6H5x3.6L2	1,26	0,84
7.2H2x7.2L1	1,29	1,43
7AH2x7.2L1	1,4	1,4
7AH2x7.12L2	1,4	1,8
7.9H2x7.2L1 (L1)	1,4	1,4
7.9H2x7.12L1	1,2	1,1
7.9H2x7.12L2(L1+ 2)	0,4	0,4
7.11 H1x7.2L1	1,75	1,39
7.11H1x7.11L1	0,41	0,47
7.11 H2x7.2L1(L1)	1	0,6
7.11H2x7.9L 1(L1)	0,1	1
8.1 H1x8.2L1	1,3	1,6

Tabela 9: Valores K_D para Fab MS-R clonado de forma cruzada se ligando a fibras de A β 1-4 e A β 1-42 conforme determinado no Biacore. A preparação de Fabs clonados de forma cruzada é descrita no Exemplo 13. Os valores K_D foram determinados através de ajustes da curva cinética e corrigidos para o teor do Fab ativo presente em cada amostra conforme descrito no texto. Alguns dos Fabs foram

adicionalmente purificados através de cromatografia de exclusão de tamanho ou ultracentrifugação preparativa para remover material agregado. (L1), o clone aceitador amadurecido com H-CDR2 recebeu apenas L-CDR1 do clone doador melhorado de L-CDR1; (L1+2), o clone aceitador amadurecido com H-CDR2 recebeu L-CDR1+2 do clone doador melhorado de L-CDR1.

Exemplo 14: Decoração de placa amiloide *in vivo* em um modelo de camundongo da doença de Alzheimer conforme revelado através de microscopia de escaneamento a laser e análise de colocalização

[00183] Anticorpos IgG1 MS-R selecionados foram testados em camundongos transgênicos duplos APP/PS2 (Referência: Richards e outros, *Soc. Neurosci. Abstr.*, Vol. 27, Programa No. 5467, 2001) para decoração de placa amiloide *in vivo*. Os anticorpos (1 mg/camundongo) foram administrados i.v. e após 3 dias os cérebros foram perfundidos com solução salina e preparados para crio-seção. Em um outro estudo os camundongos foram expostos a concentrações mais altas dos anticorpos, isto é, 2 mg injetados i.v. nos dias 0, 3 e 6 e sacrificados no dia nove. A presença dos anticorpos ligados a placas amiloide foi avaliada em seções criostáticas não-fixadas através de imunofluorescência indireta marcada dupla usando um (H+L) IgG anti-humano de cabra conjugado a Cy3 (No. 109-165-003, *Jackson Immuno Research*) seguido pelo imunoconjugado BAP-2-Alexa488. Imagem foi feita através de microscopia a laser confocal e processamento de imagem para detecção quantitativa de colocalizações através dos softwares IMARIS e COLOCALIZATION (Bitplane, Suíça). Exemplos típicos são mostrados nas Figuras 10-14. Todos os anticorpos MS-R testados foram verificados como sendo positivos em imunomarcagem de placas amiloide *in vivo*, embora alguma variabilidade tenha sido notada.

Exemplo 15: Investigação de ligação de anticorpos monoclonais diferentes à proteína precursora de amiloide (APP) sobre a superfície das células HEK293.

[00184] APP é amplamente expressa no sistema nervoso central. A ligação de anticorpo à APP de superfície celular pode levar à ativação do complemento e destruição celular em áreas do cérebro saudável. Desse modo, é obrigatório que os anticorpos A-beta terapêuticos sejam destituídos de reatividade para APP. Anticorpos de alta afinidade contra o domínio N-terminal de A-beta (por exemplo, BAP-1, BAP-2) reconhecem o respectivo epítipo também na estrutura principal de APP. Em contraste, os anticorpos contra o epítipo médio (por exemplo, 4G8), e os anticorpos da invenção são surpreendentemente incapazes de reconhecer para a APP da superfície celular. Desse modo, anticorpos da invenção que decoram A-beta, mas não APP *in vivo*, são superiores a anticorpos não-seletivos.

[00185] O método de citometria de fluxo é bem conhecido na técnica. Unidades relativas de fluorescência (FL1-H) medidas através de citometria de fluxo indicam ligação de superfície celular do respectivo anticorpo. Uma mudança de fluorescência na HEK293 transfectada com APP comparada com células HEK293 não-transfectadas indica a reação indesejada com APP da superfície celular. Como um exemplo, anticorpos BAP-1 e BAP-2 contra o domínio N-terminal mostram uma mudança significativa do sinal FL-1 em HEK293/APP (linha fina) comparado com células HEK293 não-transfectadas (linha pontilhada). O anticorpo 4G8 (específico para o epítipo A-beta médio) e todos os anticorpos da invenção (específicos para epítipos A-beta N-terminais e médios) não mostram nenhuma mudança significativa na fluorescência. Diferenças na fluorescência basal entre HEK293/APP e células HEK293 são devido a tamanho

celular diferente. Um instrumento FACScan foi usado em combinação com o pacote de Software Cellquest Pro (ambos Becton Dickinson).

Exemplo 16: Lista de SEQ ID NOs identificadas com relação às moléculas de anticorpo da invenção

[00186] A Tabela 10 anexa refere-se a sequências conforme aqui definido para algumas moléculas de anticorpo da invenção específicas.

Tabela 10: Identificação da SEQ ID N^{OS} para anticorpos de origem, bem como moléculas de anticorpo otimizados, maduras e/ou clonadas com cruzamento.

No. Da Molécula	VH prot	VL prot	VH DNA	VL DNA	HCDR3	HCDR3	LCDR3	LCDR3
					prot	DNA	prot	DNA
3	4	10	3	9	22	21	16	15
7	6	12	5	11	24	23	18	17
8	8	14	7	13	26	25	20	19
3.6H5 x 3.6L2	33	47	32	46	61	60	75	74
3.6H8 x 3.6L2	35	49	34	48	63	62	77	76
7.4H2 x 7.2L1	37	51	36	50	65	64	79	78
7.9H2 x 7.12L2	39	53	38	52	67	66	81	80
7.9H4 x 7.12L2	41	55	40	54	69	68	83	82
7.11H1x7.11L1	43	57	42	56	71	70	85	84
7.11H1x7.2L1	45	59	44	58	73	72	87	86
7.9H7	89	91	88	90	93	92	95	94
3.3H1x3.4L9	295	325	294	324	355	354	385	384
3.4H1x3.4L9	297	327	296	326	357	356	387	386
3.4H3x3.4L7	299	329	298	328	359	358	389	388
3.4H3x3.4L9	301	331	300	330	361	360	391	390

Tabela 10: Identificação da SEQ ID N^{os} para anticorpos de origem, bem como moléculas de anticorpo otimizados, maduras e/ou clonadas com cruzamento. (Continuação)

No. Da Molécula	VH prot	VL prot	VH DNA	VL DNA	HCDR3	HCDR3	LCDR3	LCDR3
3.4H7x3. 4L9	303	333	302	332	363	362	393	392
3.4H7x3. 4L7	305	335	304	334	365	364	395	394
3.6H5x3. 6L1	307	337	306	336	367	366	397	396
7.2H2x7. 2L1	309	339	308	338	369	368	399	398
7.4H2x7. 12L2	311	341	310	340	371	370	401	400
7.9H2x7. 2L1	313	343	312	342	373	372	403	402
7.9H2x7. 12L1	315	345	314	344	375	374	405	404
7.11H2x7 .2L1	317	347	316	346	377 -	376	407	406
7.11H2x7 .9L1	319	349	318	348	379	378	409	408
7.11H2x7 .12L1	321	351	320	350	381	380	411	410
8.1H1x8. 2L1	323	353	322	352	383	382	413	412

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de anticorpo anti-peptídeo beta-A4, caracterizada pelo fato de que compreende:

(a) uma região variável VL compreendendo regiões determinantes de complementariedade L-CDR1, L-CRD2 e L-CRD3, em que:

(1) L-CDR1 compreende SEQ ID NO: 143: Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala;

(2) L-CDR2 compreende SEQ ID NO: 144: Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr; e

(3) L-CDR3 compreende SEQ ID NO: 95: Leu Gln Ile Tyr Asn Met Pro Ile; e

(b) uma região variável VH compreendendo regiões determinantes de complementariedade H-CDR1, H-CRD2 e H-CRD3, em que:

(1) H-CDR1 compreende SEQ ID NO: 146: Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser;

(2) H-CDR2 compreende SEQ ID NO: 192: Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly; e

(3) H-CDR3 compreende SEQ ID NO: 93: Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr Phe Asp Val.

2. Molécula de anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende uma região variável VH como mostrada em SEQ ID NO: 89 e uma região variável VL como mostrada em SEQ ID NO: 91.

3. Molécula de anticorpo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que compreende uma região variável VH como codificada por uma molécula de ácido nucleico como mostrada em SEQ ID NO: 88 e uma região variável VL como codificada por uma molécula de ácido nucleico como mostrada em

SEQ ID NO: 90.

4. Molécula de anticorpo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que é um anticorpo completo (imunoglobulina), um fragmento F(ab), um fragmento F(ab)₂, um anticorpo de cadeia simples, um anticorpo quimérico, um anticorpo enxertado com CDR, uma construção de anticorpo bivalente, um anticorpo sintético ou um anticorpo clonado de forma cruzada.

5. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende uma molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e um veículo, excipiente e/ou diluente farmacêutico.

6. Composição de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que é uma composição farmacêutica ou de diagnóstico.

7. Uso de uma molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de uma composição farmacêutica para a prevenção e/ou tratamento de uma doença associada com amiloidogênese e/ou formação de placa amiloide.

8. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende a molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, e um veículo, excipiente e/ou diluente farmacêutico para uso na prevenção e/ou tratamento de uma doença associada com amiloidogênese e/ou formação de placa amiloide.

9. Uso de uma molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de uma composição de diagnóstico para a detecção de uma doença associada com amiloidogênese e/ou formação de placa amiloide.

10. Composição de diagnóstico, caracterizada pelo fato de

que compreende a molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, e um veículo, excipiente e/ou diluente farmacêutico para uso na detecção de uma doença associada com amiloidogênese e/ou formação de placa amiloide.

11. Uso de uma molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de uma composição farmacêutica para a desintegração de placas β -amiloide.

12. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende a molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, e um veículo, excipiente e/ou diluente farmacêutico para uso na desintegração de placas β -amiloide.

13. Uso de uma molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de uma composição farmacêutica para imunização passiva contra formação de placa β -amiloide.

14. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende a molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, e um veículo, excipiente e/ou diluente farmacêutico para uso na imunização passiva contra formação de placa β -amiloide.

15. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 7, 9, 11 ou 13, caracterizado pelo fato de que a dita doença é demência, doença de Alzheimer, neuropatia motora, síndrome de Down, doença de Creutzfeldt Jacob, hemorragia cerebral hereditária com amiloidose do tipo Holandesa, doença de Parkinson, demência relacionada ao HIV, ALS ou distúrbios neuronais relacionados ao envelhecimento.

Fig. 1a cont.

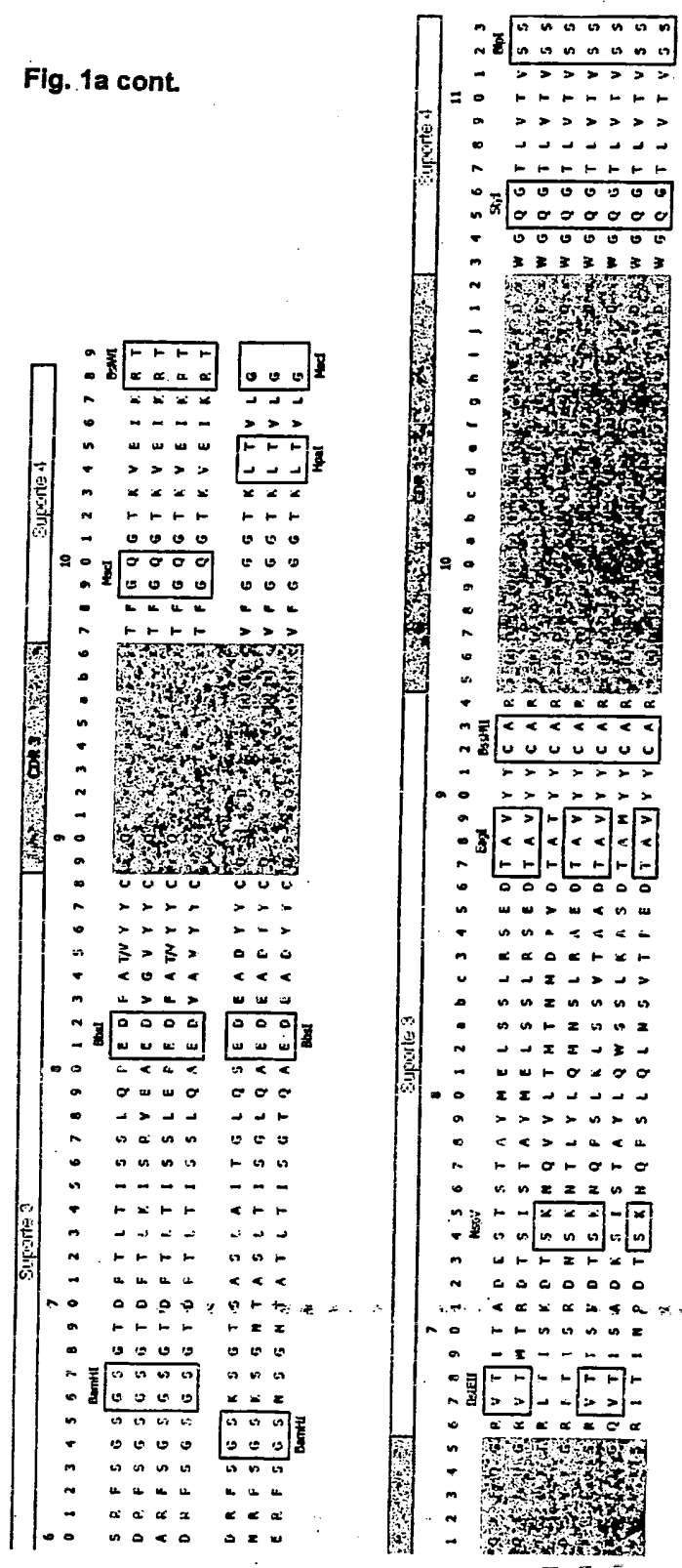


Fig. 1b

Sumário da sequência da biblioteca de HuCAL-fab1 y

VL	Suporte 1										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	
VL1	GAT ATC	CAG ATG	ACC CAG	ASC CAG	TCT ASC	CTG AGC	GGC GTC	GAT GAT	GAT GAT	ATC ATT	ATC
VL2	GAT ATC	ATG ATG	ACC CAG	ASC CAG	CTG CTA	CTG ACT	GGC GAG	CCT GGG	AGC ATT	ACC TGC	TGC
VL3	GAT ATC	CTG ATG	ACC CAG	ASC CAG	GGC GTC	AGC CTG	TCT TCT	GGC GAA	CCT GGG	AGC CTG	ATC
VL4	GAT ATC	ATG ATG	ACC CAG	ASC CAG	GAT AGC	CTG GGC	GTC GTC	GGC GAA	CCT GGC	AGC ATT	ATC
VL11	GAT ATC	GTC CTG	ACC CAG	CCG CCT	TCA GTC	AGT GAC	GAA GTA	GAT GAT	CAG AGC	ATT ACC	TGC
VL12	GAT ATC	GCA CTG	ACC CAG	CCA GCT	TCA GTC	AGC GGC	TGA CCA	GAT GAT	CAG AGC	ATT ACC	TGC
VL13	GAT ATC	GAA CTG	ACC CAG	CCG CCT	TCA GTC	AGC GTC	GTA CCA	GAT GAT	CAG AGC	ATT ACC	TGC
VH	Suporte 1										
VH	Suporte 1										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	
VH1A	CAG GTC	GAA TTG	GTT GAT	GAC GAG	GAA GTC	GAA GAA	GGC GGC	AGC GTC	AAA GTC	TGC AAA	GAC
VH1B	CAG GTC	GAA TTG	GTT GAT	GAC GAG	GAA GTC	GAA GAA	GGC GGC	AGC GTC	AAA GTC	TGC AAA	GAC
VH2	CAG GTC	GAA TTG	GTT GAT	GAC GAG	GAA GTC	GAA GAA	GGC GGC	AGC GTC	AAA GTC	TGC AAA	GAC
VH3	CAG GTC	GAA TTG	GTT GAT	GAC GAG	GAA GTC	GAA GAA	GGC GGC	AGC GTC	AAA GTC	TGC AAA	GAC
VH4	CAG GTC	GAA TTG	GTT GAT	GAC GAG	GAA GTC	GAA GAA	GGC GGC	AGC GTC	AAA GTC	TGC AAA	GAC
VH5	CAG GTC	GAA TTG	GTT GAT	GAC GAG	GAA GTC	GAA GAA	GGC GGC	AGC GTC	AAA GTC	TGC AAA	GAC
VH6	CAG GTC	GAA TTG	GTT GAT	GAC GAG	GAA GTC	GAA GAA	GGC GGC	AGC GTC	AAA GTC	TGC AAA	GAC

Fig. 1b cont.

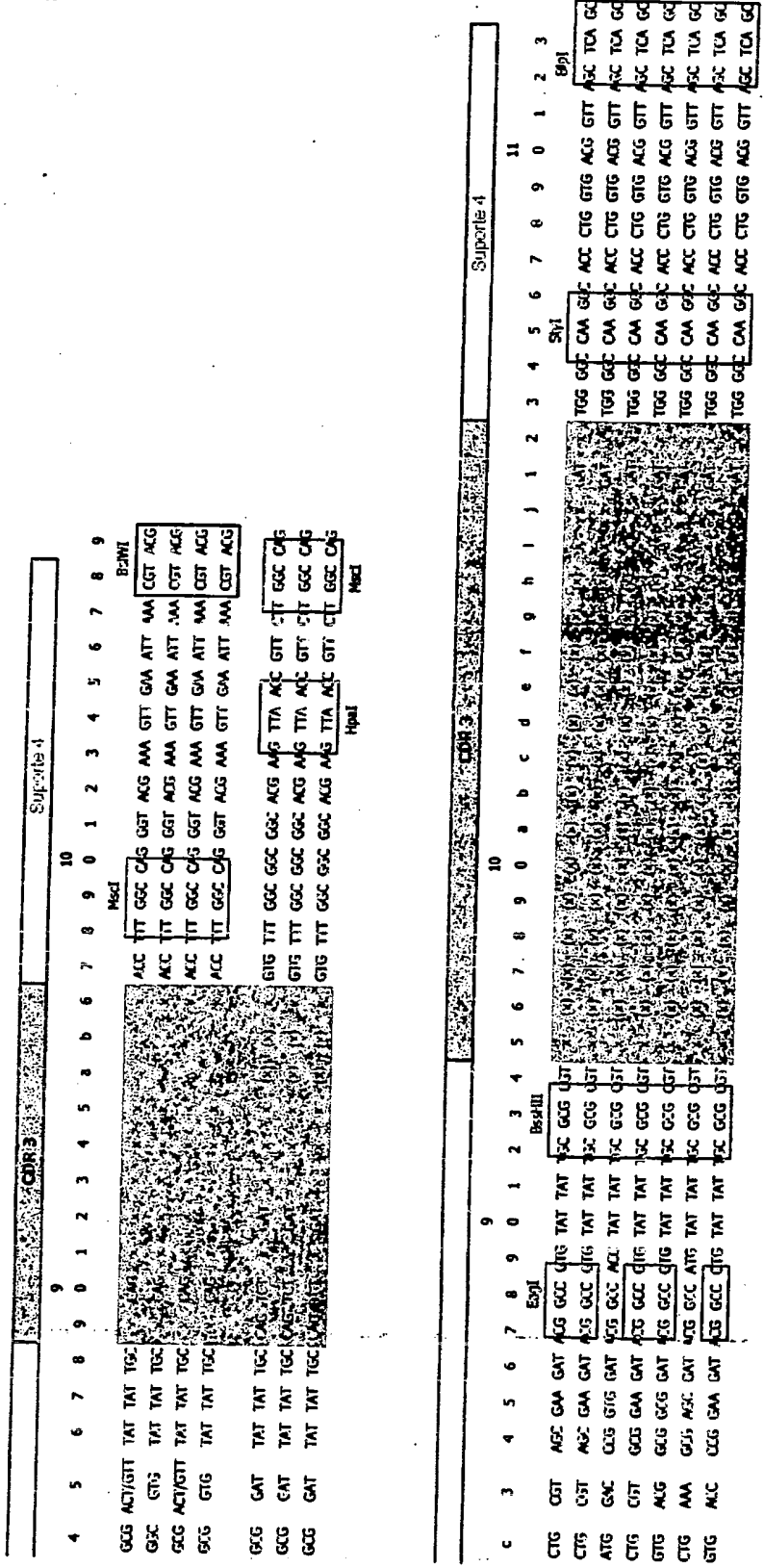


Fig. 2 cont.

CCGTGACCGA CCAAAGCGAT GGCATCGCGT CCGGCTATAG CACGACTGGG
Vk3

101 . S P A T L S L S P G E R A T L S
AGAGCCCGGC GACCCTGAGC CTGTCTCCGG GCGAACGTGC GACCCTGAGC
TCTCGGSCCG CTGGGACTCG GACAGAGGCC CGCTTGACAG CTGGGACTCG
Vk3

151 C R A S Q S V S S S Y L A W Y Q Q
TGCAGAGCGA GCCAGAGCGT GAGCAGCAGC TATCTGGCGT GGTACCAGCA
ACGTCTCGGT CGGTCTCGCA CTCGTCTCG ATAGACCGCA CCATGGTCTG
Vk3

201 . K P G Q A P R L L I Y G A S S R A
GARACCAGGT CAAGCACCGC GTCTATTAAT TTATGGCGCG AGCAGCCGTG
CTTGGTCCA GTTGGTGGG CABATAATTA AATACCGCGC TCGTCCGCAC
Vk3

251 . T G V P A R F S G S G S G T D F
CAACTGGGGT CCGGCGCGT TTTAGCGGCT CTGGATCCGG CACGGATTTT
GTGACCCCA GGGCCGCGCA AAATCGCCGA GACCTAGGCC GTGCCTAAA
Vk3

BbsI

301 F L T I S S L E P E D F A V Y Y C
ACCCTGACCA TTAGCAGCCT GGAACCTGAA GACTTTGGCG TGTATTATG
TGGACTGGT AATCGTCGGA CCTTGGACTT CTGAAACGCC ACATAATAAC
Vk3

MscI

351 . Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E
CCAGCAGCAT TATACCACCC CCGCGACCTT TGGCCAGGGT ACGAAAGTTG
GGTCTGTA ATATGGTGGG GCGGCTGGA ACCGGTCCA TGCTTTCAC
CL kappa

Vk3

BsiWI

401 . I K R T V A A P S V F I F P P S
AAATTAACG TACGGTGGCT GCTCCGAGCG TGTATTATTT TCCGCCGAGC
TTAATTTCG ATGCCACCGA CGAGGCTCGC ACAAATATAA AGGCGGCTCG
CL kappa

451 D E Q L K S G T A S V V C L L N H
GATGACAAC TGAAAGCGG CADGCGGAGC GTGGTGTGCC TGCTGAACAA
CTACTGTG ACTTTTCGCC GTGCGGCTCG CACCACCGG ACGACTTGT
CL kappa

501 . F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q
CTTTATCCG CGTGAAGCGA AAGTTCAGTG GAAAGTAGAC AACCGGCTGC
GAAATAGGC GCACCTCGCT TTCAASTCAC CTTTCATCTG TTGGCGAGC
CL kappa

551 . S G N S Q E S V T E Q D S K D S
AAAGCGGCAA CAGCCAGGAA AGCGTAGCG AACAGGATAG CAAAGATACC
TTTCCCGTIT GTCGTCCTT TCGACTGGC TTGTCTATC GTTCTATCG
CL kappa

Fig. 2 cont.

```

2851  GTAACATCG TCTTAACTCC ACCCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG
      CATTGATAGC AGAACTCAGG TTGGGCCATT CTGTGCTGAA TAGCCGGTGAC
-----
                        ColeI
2901  GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGSTATG TAGGCGGTGC
      CGTCGTCGGT GACCATGTC CTAATCGTCT CGCTCCATAC ATCCGCCACG
-----
                        ColeI
                                                Multação
2951  TACAGAGTTC TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGAACAG
      ATGTCTCAAG AACTTCACCA CCGGATTGAT GCCGATGTGA TCTTCTGTG
-----
                        ColeI
                        Multação
3001  TATTTGGTAT CTGGCTCTG CTGTAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT
      ATAAACCATA GACGCGAGAC GACATCGGTC AATGGAAGCC TTTTCTCAA
-----
                        ColeI
3051  GSTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAAACCACC GCTGCTAGCG GTGGTTTTTT
      CCATCGAGAA CTAGGCGGTT TGTTTGGTGG CGACCATCGC CACCAAAAAA
-----
                        ColeI
3101  TGTTCGAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC
      ACAAAAGTTC GTCGTCTAAT GCGCGTCTTT TTTTCTAGA GTTCTTCTAG
-----
                        ColeI
3151  CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAAACGA AAACTCACGT
      GAAACTAGAA AAGATGCCCC AGACTGCGAG TCACCTTGCT TTTGAGTGCA
-----
                        ColeI
                                                Terminador cat
-----
                        BglII
-----
3201  TAAGGGATTT TGGTCAGATC TAGCACCAGG CGTTTAAAGG CACCAATAAC
      ATCCCTAAA ACCAGTCTAG ATCGTGGTCC GCAAATTCCC GTGGTTATTG
-----
                        ColeI
Terminador cat
-----
3251  TGCCITAAA AAATTACGCC CCGCCCTGCC ACTCATCGCA GTACTGTTGT
      ACGGAATTT TTTAATCCGG GCGGGACGG TGAGTAGCGT CATBACAACA
-----
                        CM(R)
3301  AATTCATTAA GCATTCTGCC GACATGGAAG CCATCACAAA CGGCATGATG
      TTAGTAATT CGTAGACGG CTGTACCTTC GGTAGTGTFT GCCGTACTAC
-----
                        CM(R)
3351  AACCTGAATC GCCAGCGGCA TCAGCACCTT GTCGCCTTGC GTATAATATT
      TTGGAATTAG CGTCCCGCT AGTCGTGGAA CAGCGGAACG CATATTATA
-----
                        CM(R)
3401  TGCCCATAGT GAAAACG333 GCGAAGAGT TCTCCATATT GGCTACGTTT
      ACGGGTATCA CTTTTGCCCC CGCTTCTTCA ACAGGTATAA CCGATGCAA
-----
                        CM(R)
3451  AAATCAAAC TGGTAAACT CACCCAGGGA TTGGCTGAGA CGAAAAACAT
      TTTAGTTTTG ACCACTTGA GTGGGTCCCT AACCGACTCT GCTTTTTGTA
-----

```

Fig. 2 cont.

```

3501      ATTCGCAATA AACCCITTTAG GGAATAGGC CAGGTTTTCA CCGTAACACG
          TAAGAGTTAT TTGGGAAATC CCTTTATCCG GTCCAAAAGT GGCATTGTGC
          -----
          CM (R)
3551      CCACATCTTG CGAATATATG TGTAGAAACT GCCGGAAATC GTCGTGGTAT
          GGTGTAGAAC GCTTATATAC ACATCTTTGA CGSCCTTTAG CAGCACCATA
          -----
          CM (R)
3601      TCACTCCAGA GCGATGAAAA CGTTTCAGTT TGCTCATGGA AAACGGTGTG
          AGTGAGGTCT CGCTACTTTT GCRAAGTCAA ACGAGTACCT TTTGCCACAT
          -----
          CM (R)
3651      ACAAGGGTGA ACACTATCCC ATATCACCAG CTCACCGTCT TTCATTGCCA
          TGTCCCACT TGTGATAGGG TATAGTGGTC GAGTGGCAGA AAGTAACGGT
          -----
          CM (R)
3701      TACGGAACTC CGGSTGAGCA TTTCATCAGGC GGGCAAGAAT GTGAATAAAG
          ATGCCCTGAG GCCCACTCGT AAGTAGTCCG CCCGTTCTTA CACTTATTTT
          -----
          CM (R)
3751      GCCGATAAAA ACTDSTGCTT ATTTTCTTT ACGGTCTTTA AAAAGGCCGT
          CGGCCTATTT TGAACACGAA TAAAAGAAA TGCCAGAAAT TTTTCCGGCA
          -----
          CM (R)
3801      AATATCCAGC TGAACGGTCT GGTATAGGT ACATTGAGCA ACTGACTGAA
          TTATAGGTCT ACTTGCCAGA CCAATATCCA TGTAAGTCTG TGAAGTACTT
          -----
          CM (R)
3851      ATGCCTCAA ATGTTCTTTA CGATGCCATT GGGATATATC AACCGTGGTA
          TACGGAGTTT TACAAGAAAT GCTACGGTAA CCCTATATAG TTGCCACCAT
          -----
          CM (R)
3901      TATCCAGTGA TTTTTTCTC CATTTTAGCT TCCTTAGCTC CTGAAAATCT
          ATAGSTCACT AAAAAGAG GTAAAATCGA AGGAATCGAG GACTTTTAGA
          -----
          CM (R)                                     SD
          -----
          Promotor cat
3951      CGATAACTCA AAAAATACGC CCGGTAJTG TCTTATTTCA TTATGGTGAA
          GCTATTGAGT TTTTATGCG GGCCATCACT AGAATAAAGT AATACCACTT
          -----
          Promotor cat
          Sitio CRP
          -----
4001      AGTTGGAACC TCACCCGAGG TCTAATGTGA GTTAGCTCAC TCATTAGGCA
          TCAACCTTGG AGTGGCTGC AGATTACACT CAATCGAGTG AATAATCCGT
          -----
          Promotor cat
          lac mRNA
          start
          -----
          Operador lac
          -----
          Região -35
          -----
          Região -10
          -----
4051      CCCCAGGTT TACACTTTAT GCTTCGGCT CGTATGTTGT GTGGAATTGT
          GGGTCCGAA ATGTGAAATA CGAAGGCCGA GCATACAACA CACCTTAACA
          Operador lac          SD          lacZ
          -----
4101      GAGCGATAA CAATTCACA CAGGAACAG CTATGACCAT GATTACGAAT
    
```

14/43

14/43 ' Fig. 2 cont.

CTCGCCTATT GTTAAAGTGT GTCCTTTGTC GATACTGGTA CTAATGCTTA
lacZ'

4151 -
T
A

Fig. 3

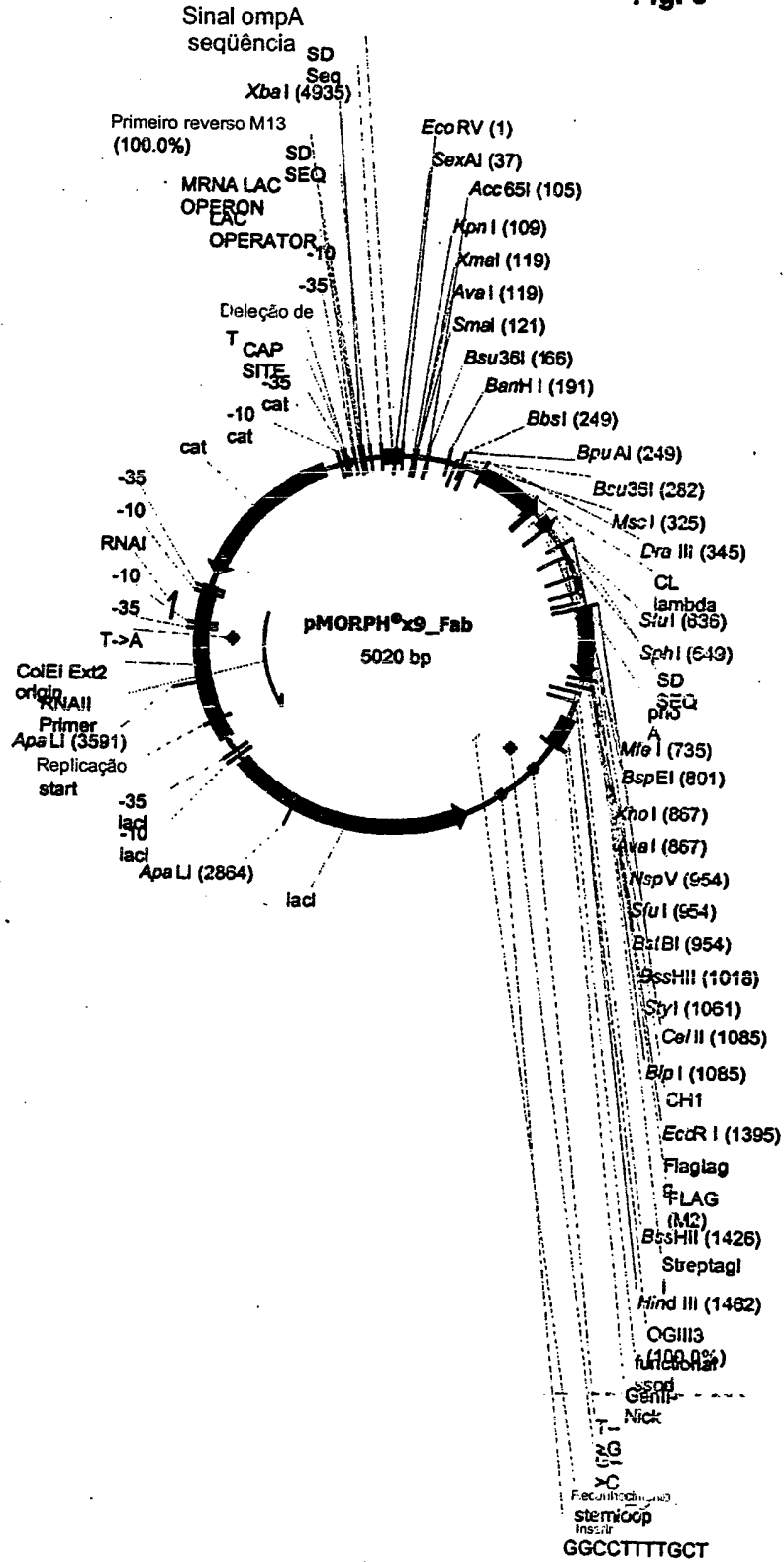
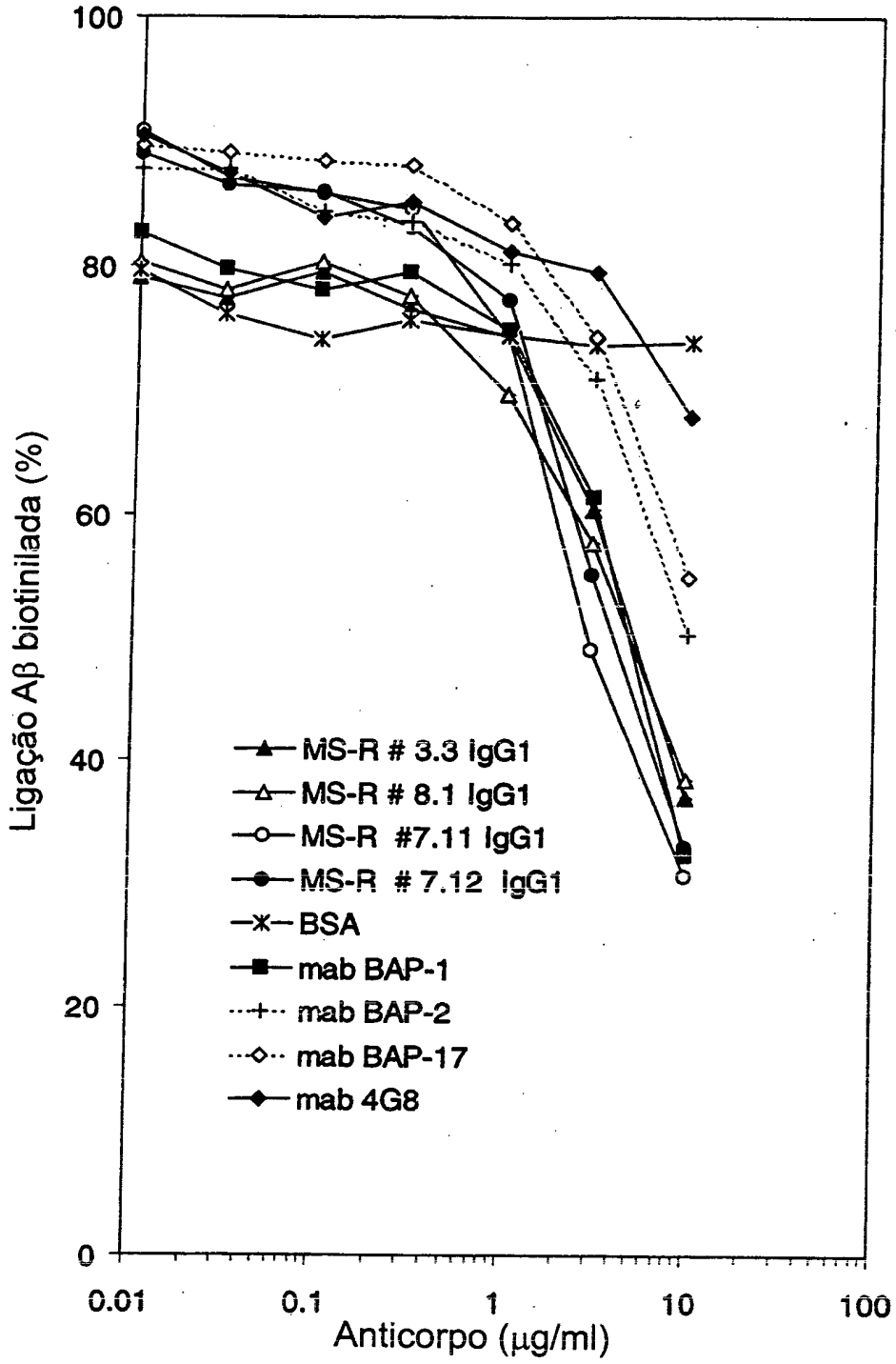


Fig. 9A



32/43

Fig. 9B

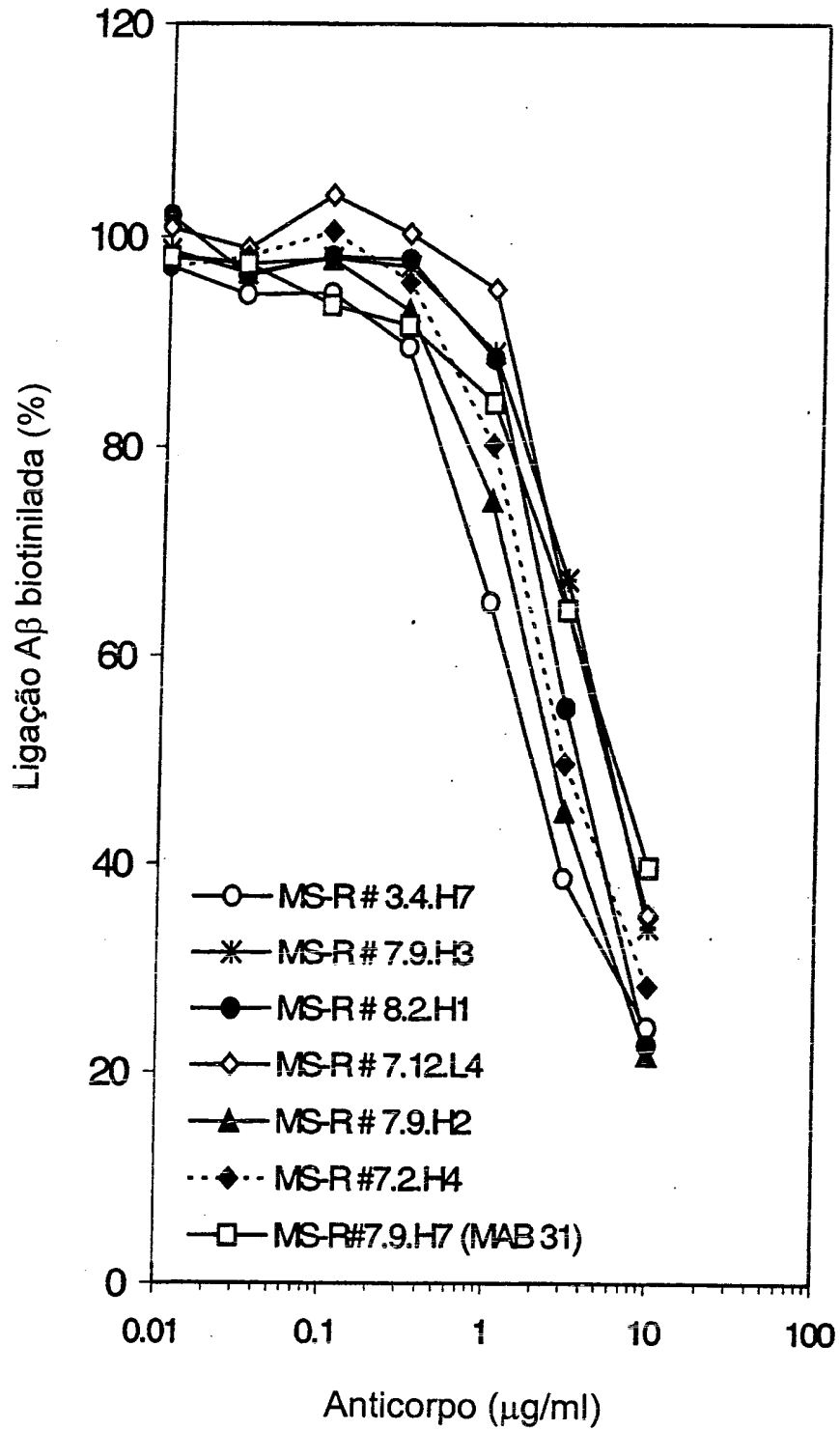


Fig. 9C

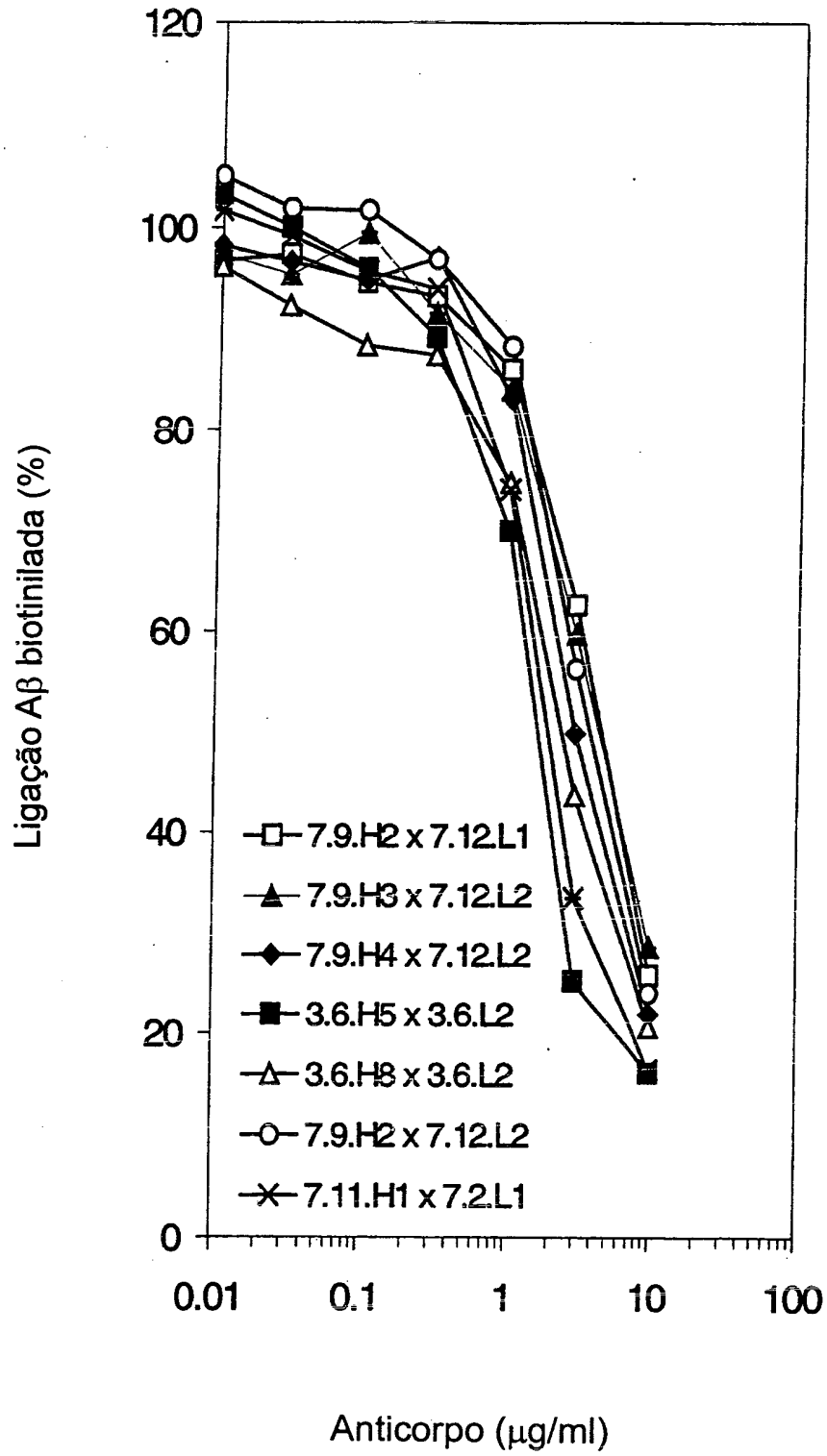


Fig. 9D

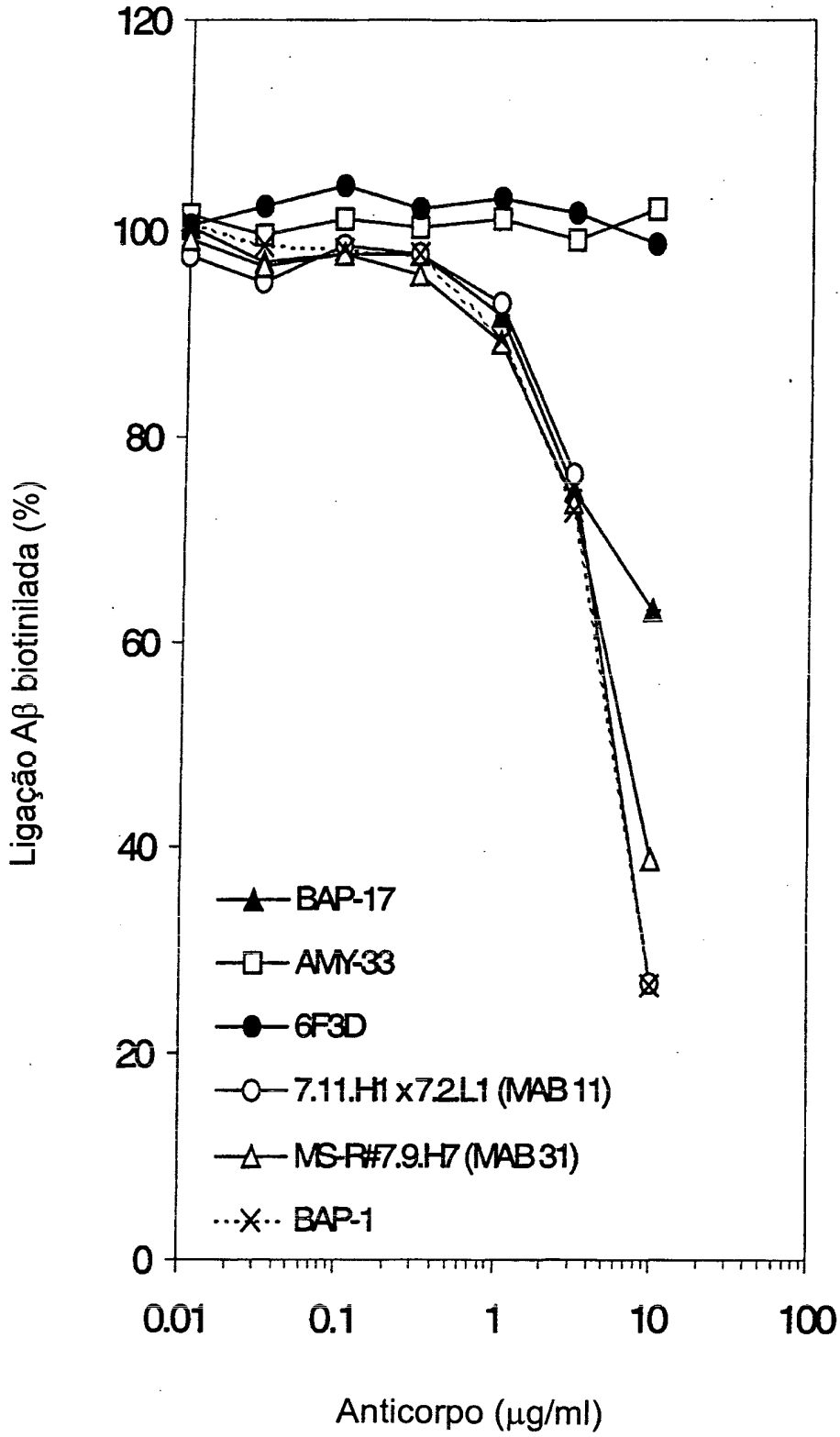


Fig. 10

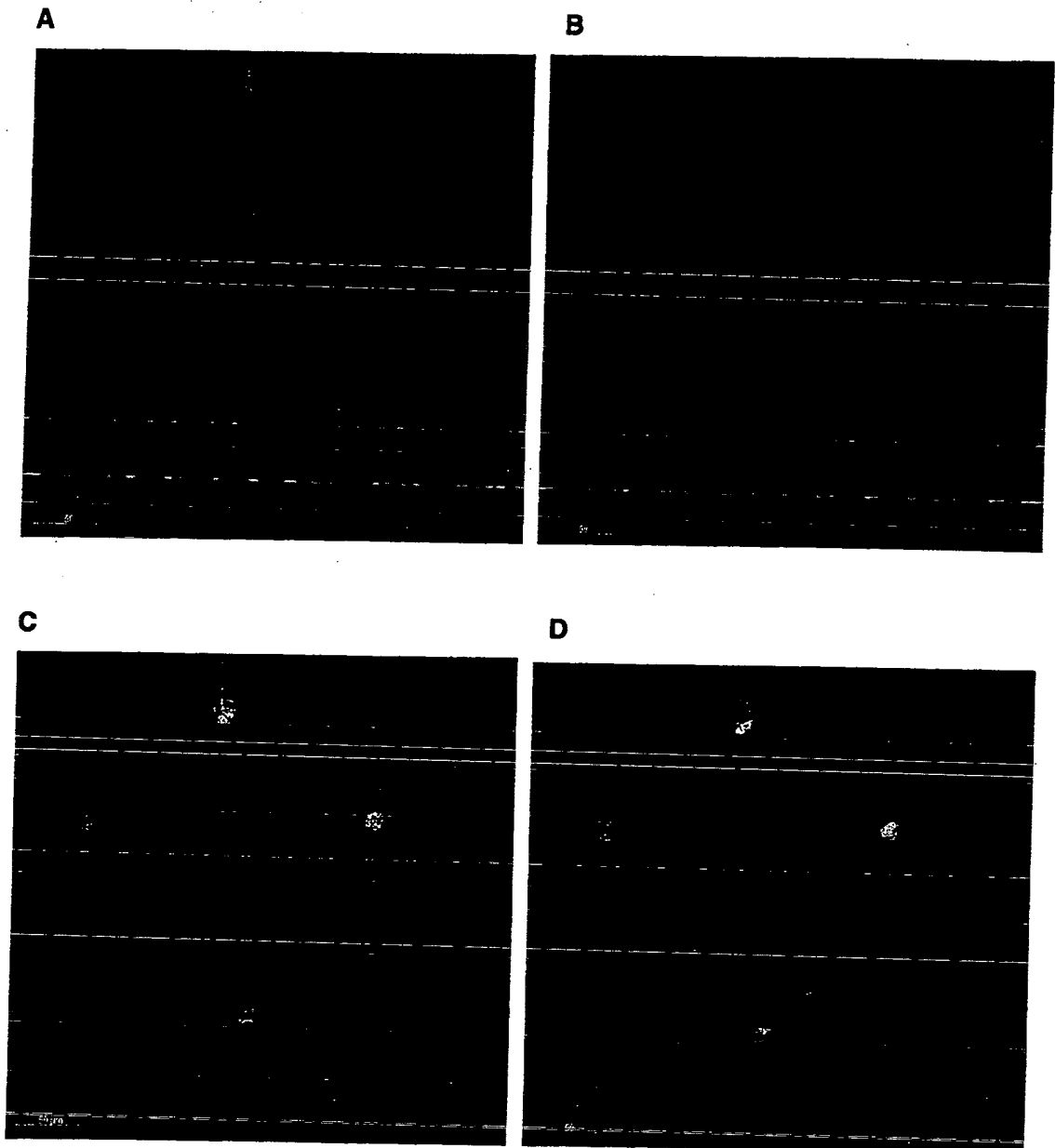
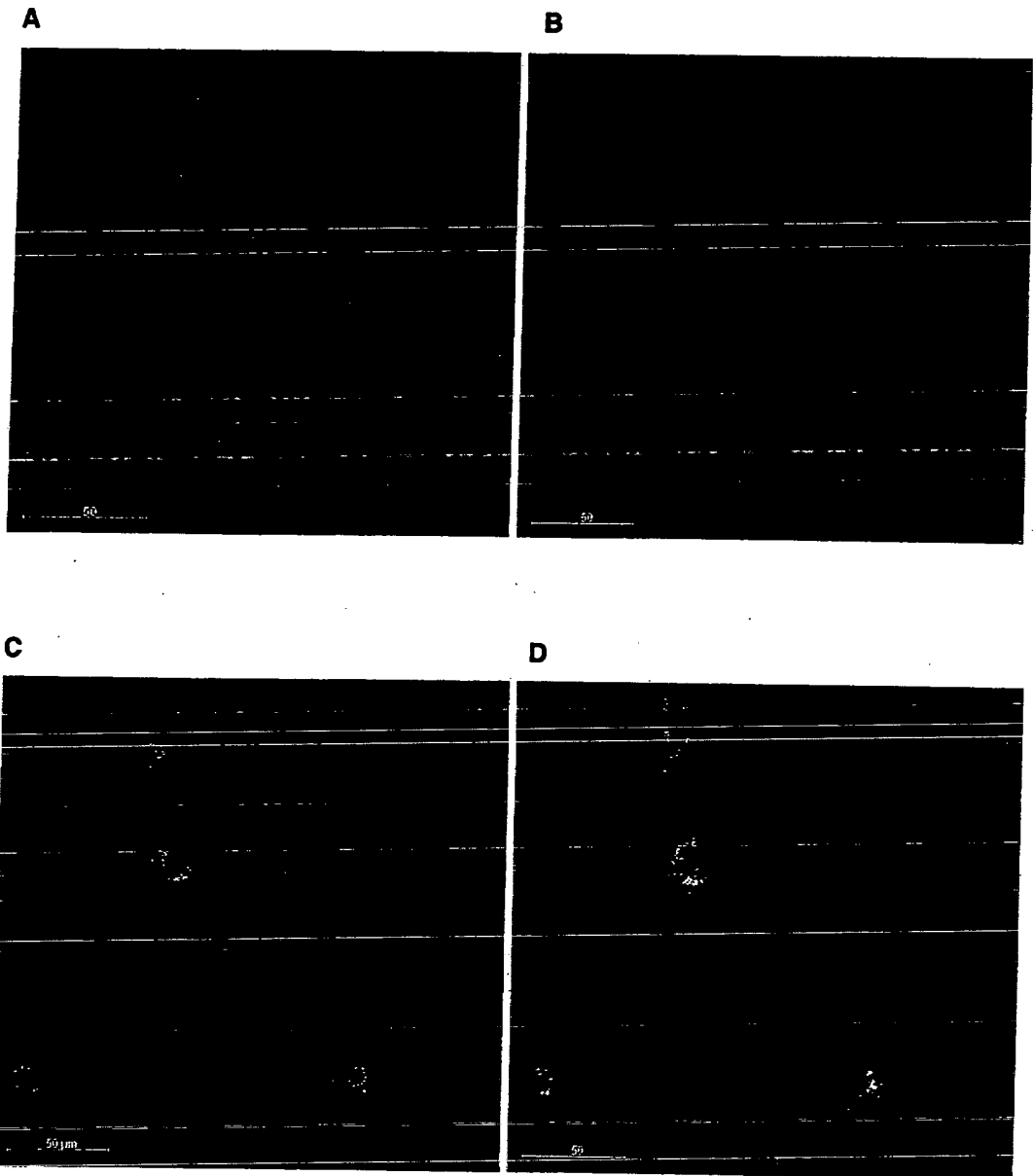


Fig. 11



37/43

Fig. 12

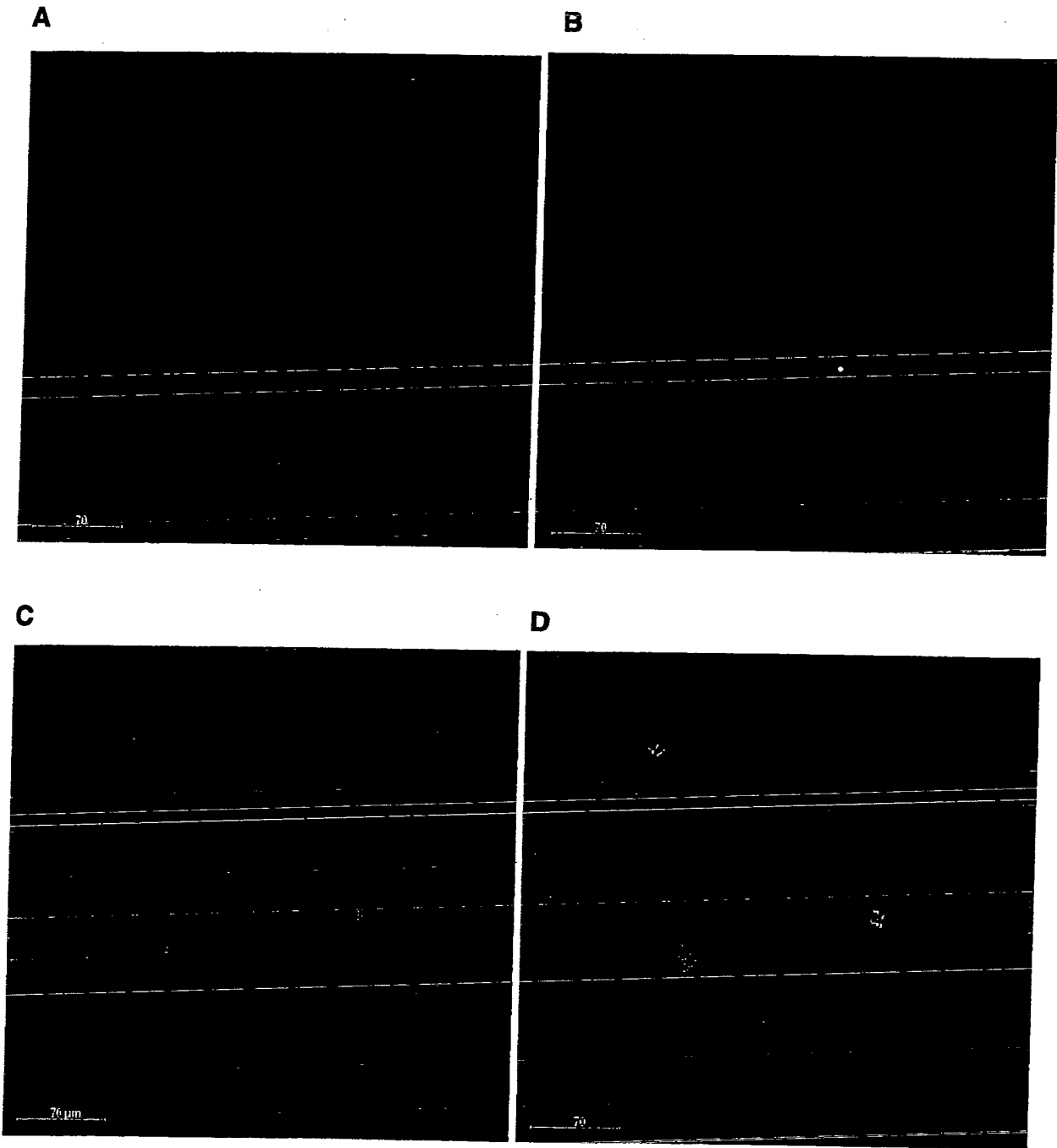
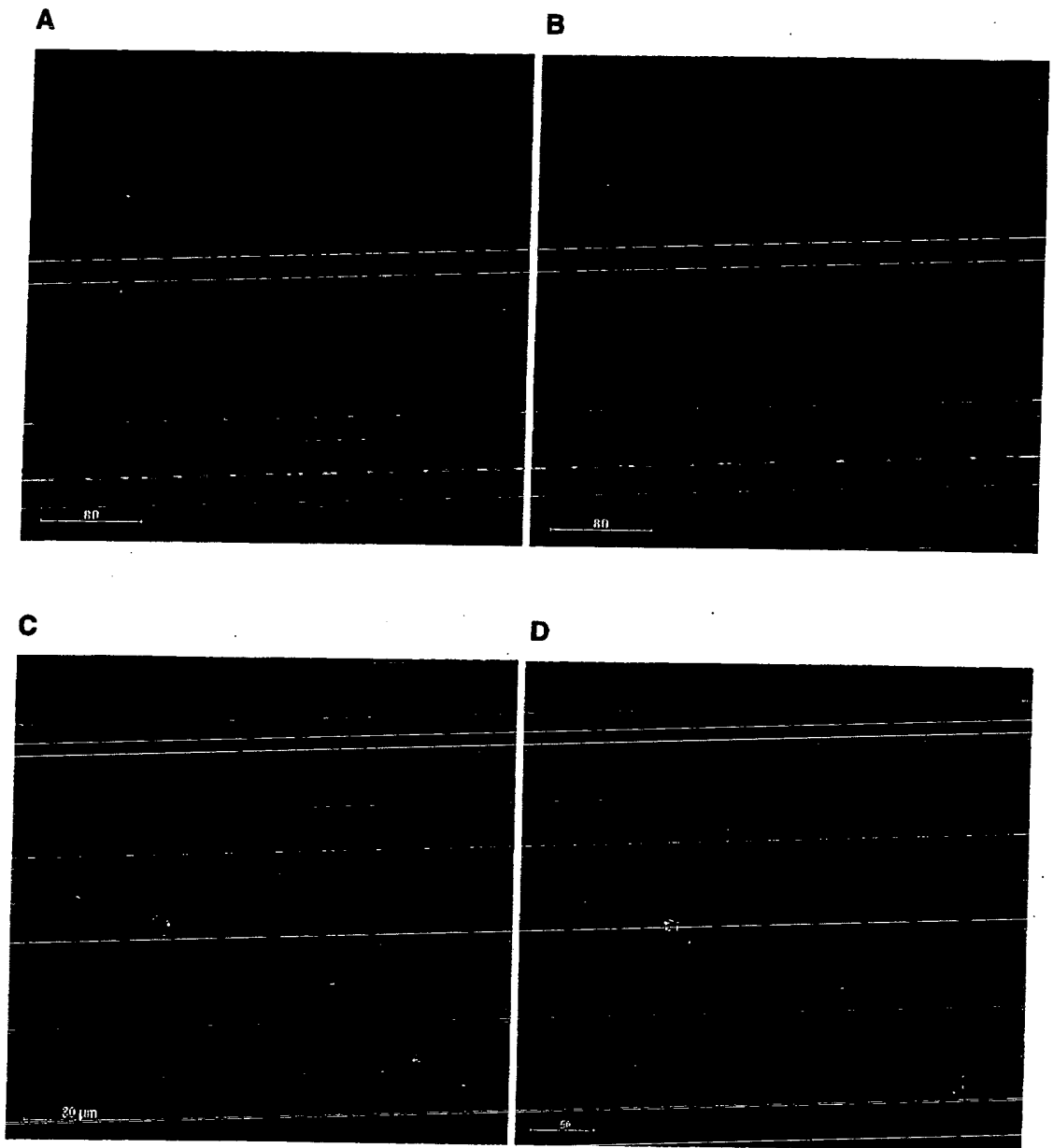
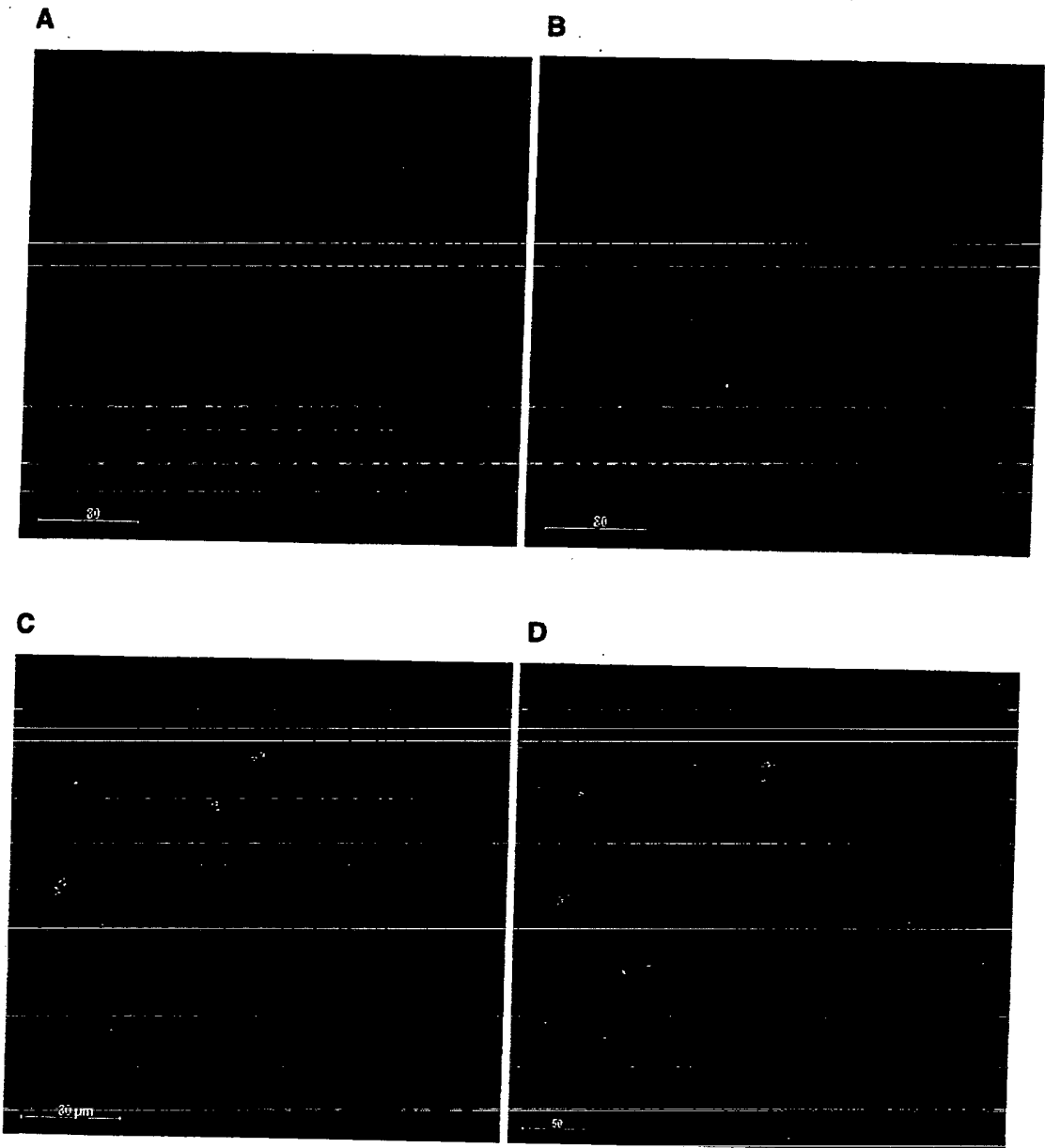


Fig. 13



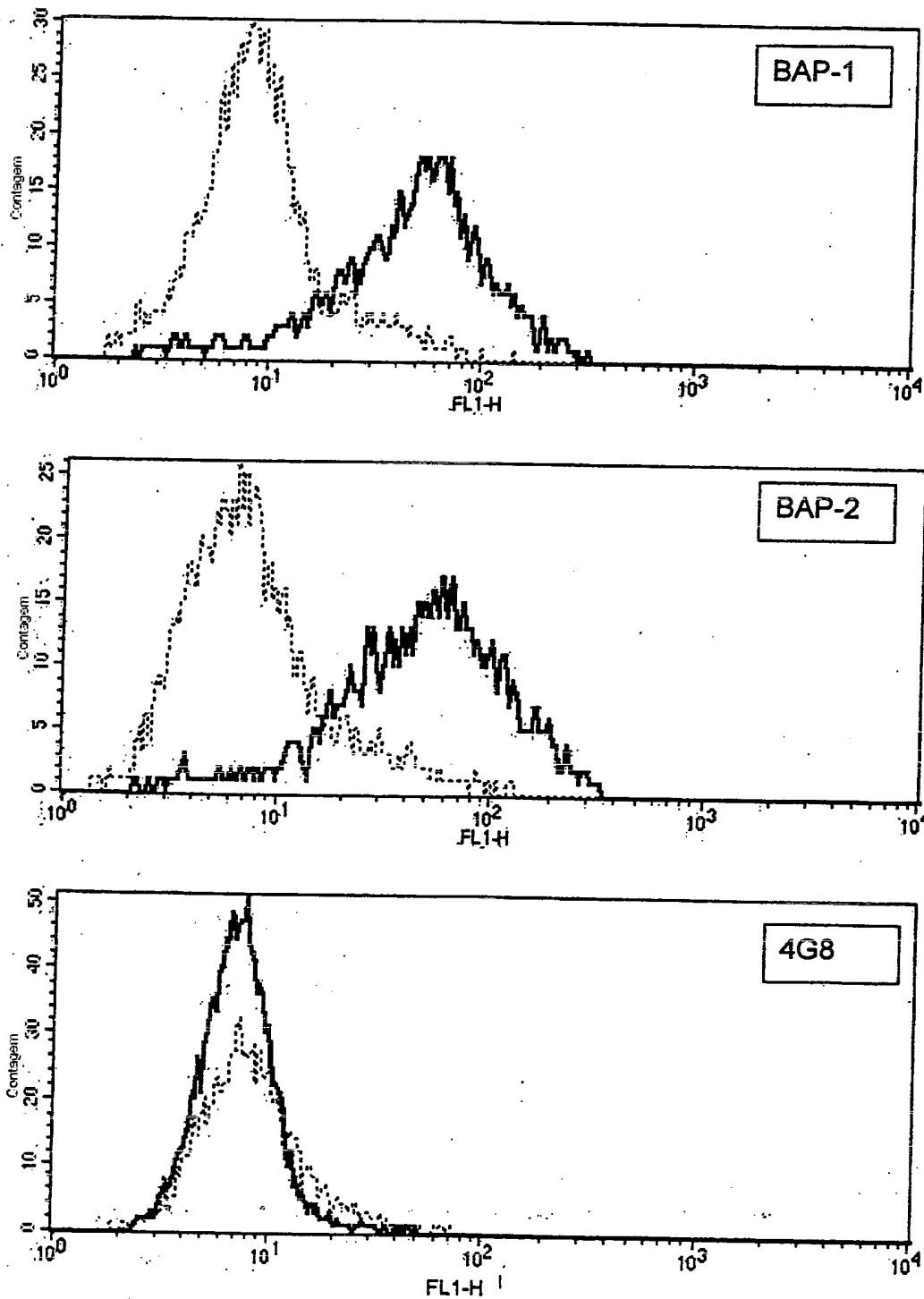
39/43

Fig. 14



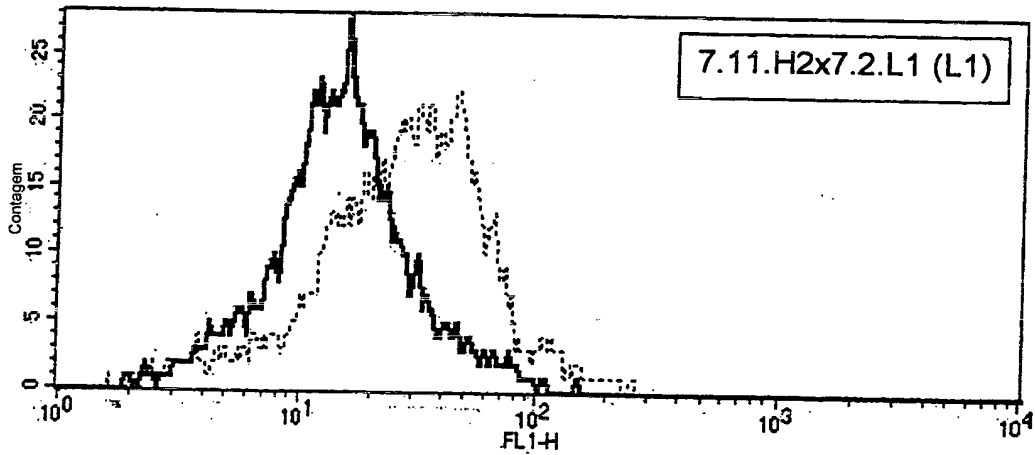
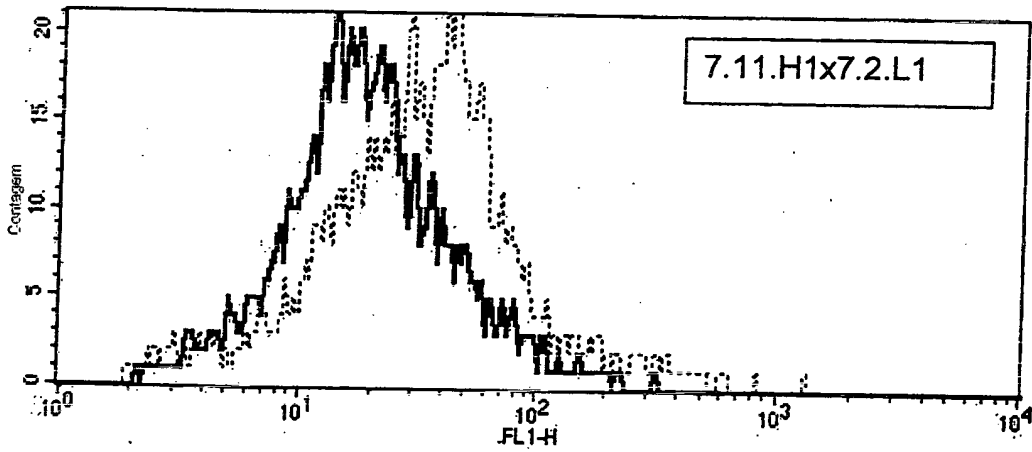
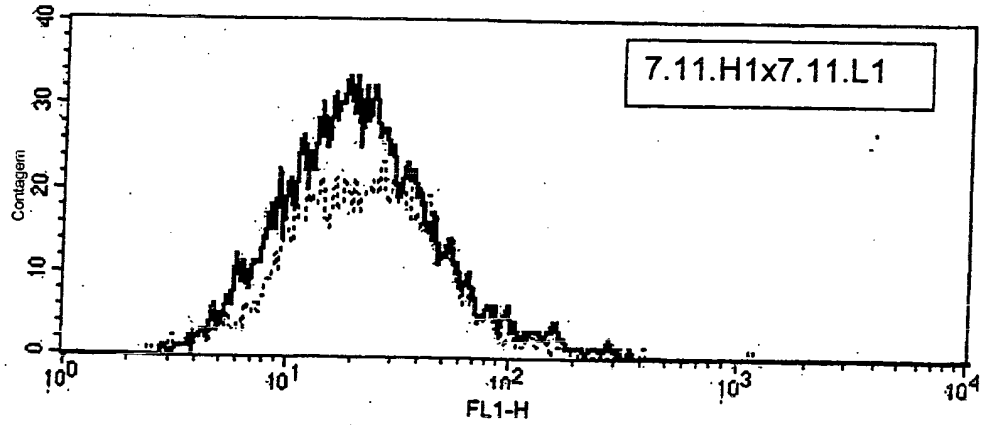
40/43

Fig. 15 - 1



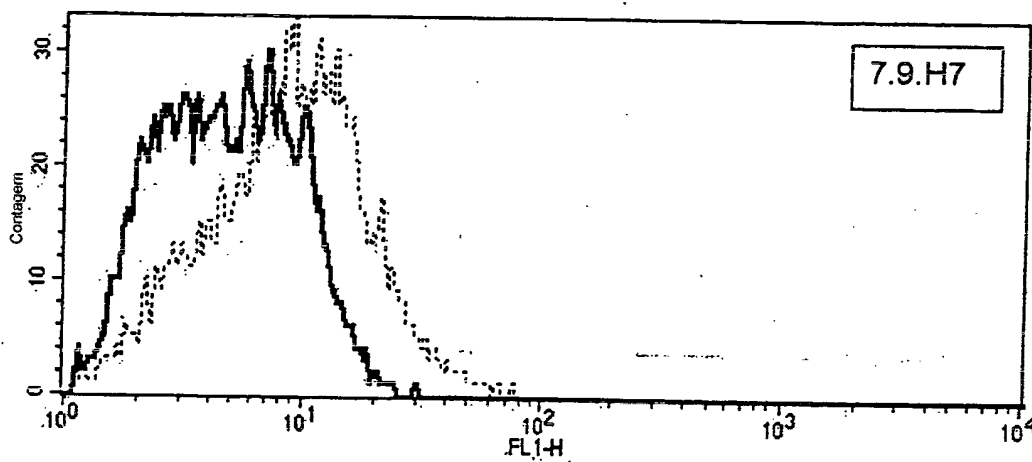
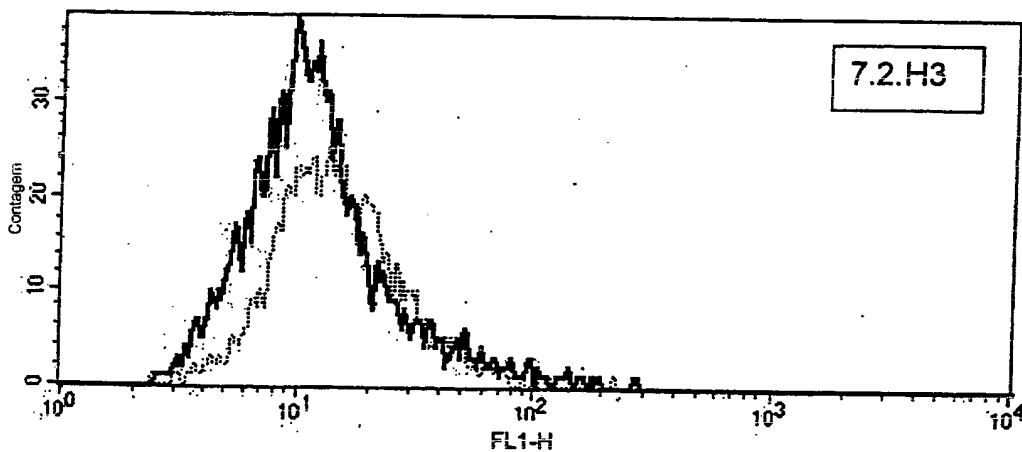
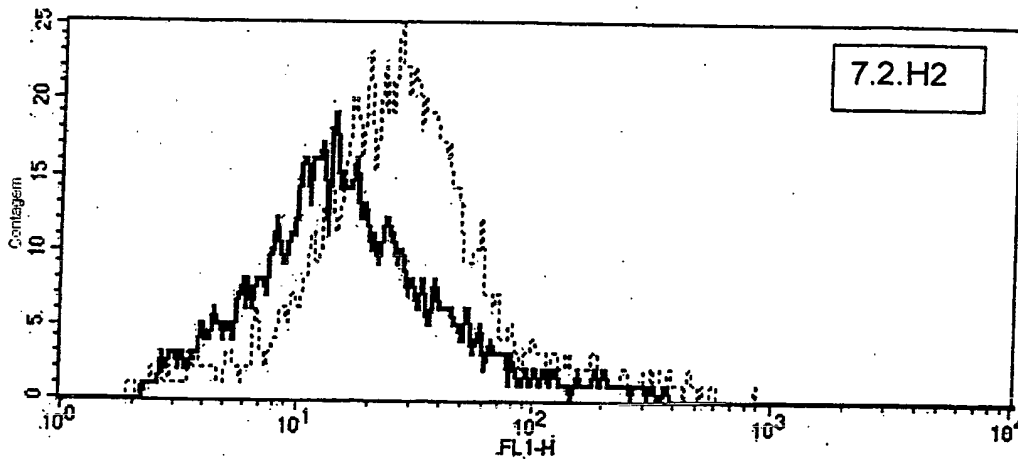
41/43

Fig. 15 - 2



42/43

Fig. 15 - 3



43/43

Fig. 15 - 4

