(11) Número de Publicação: **PT 1954718 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 16/18 (2014.01) ***A61K 38/00*** (2014.01)
C07K 14/47 (2014.01)

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

(22) Data de pedido: **2006.11.30**

(30) Prioridade(s): **2005.11.30 US 740866 P**
2006.03.03 US 779171 P
2006.03.30 US 787361 P
2006.09.05 US 842400 P

(43) Data de publicação do pedido: **2008.08.13**

(45) Data e BPI da concessão: **2014.09.03**
240/2014

(73) Titular(es):
ABBVIE INC.
1 NORTH WAUKEGAN ROAD NORTH CHICAGO, IL 60064 **US**
ABBVIE DEUTSCHLAND GMBH & CO KG **DE**

(72) Inventor(es):
BORIS LABKOVSKY **US**
STEFAN BARGHORN **DE**
HEINZ HILLEN **DE**
ULRICH EBERT **DE**
PATRICK KELLER **DE**

(74) Mandatário:
ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS ANTI-GLOBULÓMEROS AΒ, SUAS PORÇÕES DE LIGAÇÃO AO ANTIGÉNIO, CORRESPONDENTES HIBRIDOMAS, ÁCIDOS NUCLEICOS, VECTORES, CÉLULAS HOSPEDEIRAS, MÉTODOS DE PRODUÇÃO DOS DITOS ANTICORPOS, COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO OS DITOS ANTICORPOS, USOS DOS DITOS ANTICORPOS E MÉTODOS PARA USO DOS DITOS ANTICORPOS**

(57) Resumo:
SÃO DESCRITOS ANTICORPOS ANTI-GLOBULÓMEROS AΒ, SUAS PORÇÕES DE LIGAÇÃO AO ANTIGÉNIO, CORRESPONDENTES HIBRIDOMAS, ÁCIDOS NUCLÉICOS, VECTORES, CÉLULAS HOSPEDEIRAS, MÉTODOS DE PRODUÇÃO DOS DITOS ANTICORPOS, COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO OS DITOS ANTICORPOS, USOS DOS DITOS ANTICORPOS E MÉTODOS PARA USO DOS DITOS ANTICORPOS. A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A ANTICORPOS ANTI-GLOBULÓMEROS AΒ TENDO UMA AFINIDADE DE LIGAÇÃO PARA COM O GLOBULÓMERO AΒ(20-42) QUE É MAIOR QUE A AFINIDADE DE LIGAÇÃO DO ANTICORPO PARA COM O GLOBULÓMERO AΒ(1-42), SUAS PORÇÕES DE LIGAÇÃO AO ANTIGÉNIO, HIBRIDOMAS QUE PRODUZEM OS DITOS ANTICORPOS, ÁCIDOS NUCLÉICOS QUE CODIFICAM OS DITOS ANTICORPOS, VECTORES COMPREENDENDO OS DITOS ÁCIDOS NUCLEICOS, CÉLULAS HOSPEDEIRAS COMPREENDENDO OS DITOS VETORES, MÉTODOS DE PRODUÇÃO DOS DITOS ANTICORPOS, COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO OS DITOS ANTICORPOS, USOS TERAPÊUTICOS E EM DIAGNÓSTICO DOS DITOS ANTICORPOS E MÉTODOS CORRESPONDENTES RELACIONADOS COM A DOENÇA DE ALZHEIMER E OUTRAS AMILOIDOSES.

RESUMO

"Anticorpos anti-globulómeros A , suas porções de ligação ao antigénio, correspondentes hibridomas, ácidos nucleicos, vectores, células hospedeiras, métodos de produção dos ditos anticorpos, composições compreendendo os ditos anticorpos, usos dos ditos anticorpos e métodos para uso dos ditos anticorpos"

São descritos anticorpos anti-globulómeros A , suas porções de ligação ao antigénio, correspondentes hibridomas, ácidos nucléicos, vectores, células hospedeiras, métodos de produção dos ditos anticorpos, composições compreendendo os ditos anticorpos, usos dos ditos anticorpos e métodos para uso dos ditos anticorpos. A presente invenção refere-se a anticorpos anti-globulómeros A tendo uma afinidade de ligação para com o globulómero A (20-42) que é maior que a afinidade de ligação do anticorpo para com o globulómero A (1-42), suas porções de ligação ao antigénio, hibridomas que produzem os ditos anticorpos, ácidos nucléicos que codificam os ditos anticorpos, vectores compreendendo os ditos ácidos nucleicos, células hospedeiras compreendendo os ditos vetores, métodos de produção dos ditos anticorpos, composições compreendendo os ditos anticorpos, usos terapêuticos e em diagnóstico dos ditos anticorpos e métodos correspondentes relacionados com a doença de Alzheimer e outras amiloidoses.

DESCRIÇÃO

"Anticorpos anti-globulómeros A , suas porções de ligação ao antigénio, correspondentes hibridomas, ácidos nucleicos, vectores, células hospedeiras, métodos de produção dos ditos anticorpos, composições compreendendo os ditos anticorpos, uso dos ditos anticorpos e métodos para usos dos ditos anticorpos"

A presente invenção refere-se a anticorpos anti-globulómeros A , suas porções de ligação ao antigénio, hibridomas que produzem os ditos anticorpos, ácidos nucleicos que codificam os ditos anticorpos, vectores compreendendo os ditos ácidos nucleicos, células hospedeiras compreendendo os ditos vectores, métodos de produção dos ditos anticorpos, composições compreendendo os ditos anticorpos, usos terapêutico e de diagnóstico dos ditos anticorpos e métodos correspondentes relacionados com a doença de Alzheimer e outras amiloidoses.

Em 1907, o médico Alois Alzheimer foi o primeiro a descrever as características neuropatológicas de uma forma de demência subsequentemente denominada em sua honra (Alzheimer 1907). A Doença de Alzheimer (DA) é a causa mais frequente de demência entre os idosos, com uma incidência de cerca de 10% da população acima de 65 anos. Com o aumento da idade, a probabilidade de doença também aumenta. Globalmente, existem cerca de 15 milhões de pessoas afectadas e espera-se que o aumento ainda maior de esperança de vida aumente o número de pessoas doentes em cerca de três vezes o longo das próximas décadas.

De um ponto de vista molecular, a doença de Alzheimer (DA) é caracterizada por um depósito de proteínas agregadas de maneira anormal. No caso de placas de amilóide extracelulares, estes depósitos consistem na maioria das vezes em filamentos de péptido -amilóide, no caso dos emaranhados neurofibrilares intracelulares (NFT) da proteína tau. O péptido -amilóide (A) surge da proteína precursora do -amilóide por clivagem proteolítica. Esta clivagem é realizada pela actividade cooperativa de diversas proteases denominadas secretase , e . A clivagem leva a vários

fragmentos específicos de diferentes comprimentos. As placas de amilóide consistem principalmente em péptidos com um comprimento de 40 ou 42 aminoácidos (A 40, A 42). O prod de clivagem dominante é o A 40; contudo, o A 42 tem um efei tóxico muito mais forte.

Os depósitos cerebrais de amilóide e deficiências cognitivas muito similares aos observados na doença de Alzheimer também são características distintivas da síndrome de Down (trissomia 21), que ocorre com uma frequência de cerca de 1 em 800 nascimentos.

A hipótese de cascata de amilóide de Hardy e Higgins postulou que uma maior produção de A (1-42) levaria à formação de protofibrilhas e fibrilhas, os componentes principais de placas de A , estas fibrilhas sendo responsáveis pelos sintomas da doença de Alzheimer. A despeito da fraca correlação entre a gravidade da demência e a carga de placa de A depositada, esta hipótese foi favorecida até recentemente. A descoberta de formas solúveis de A em cérebros com DA, que se correlacionam melhor com sintomas de DA do que a carga de placa levou a uma revisão da hipótese da cascata de amilóide.

A imunização activa com péptidos A leva a uma redução na formação de placas, bem como a dissolução parcial das placas existentes. Ao mesmo tempo, leva ao alívio de defeitos cognitivos em modelos de ratinho transgénico APP.

Para a imunização passiva com anticorpos dirigidos aos péptidos A foi também encontrada uma redução de uma carga de placa de A .

Os resultados de um ensaio de fase IIa (ELAN Corporation Plc, South San Francisco, CA, EUA e Dublin, RU) de imunização activa com AN-1792 (péptido A (1-42) em condição fibrilar de agregação) sugerem que a imunoterapia direccionada ao péptido A foi bem sucedida. Num subgrupo de 30 pacientes, a progressão da doença foi significativamente reduzida em pacientes com títulos de anticorpo anti-A positivos, medidos pelo índice mMSE e DAD. Contudo, este estudo foi interrompido em virtude de sérios efeitos secundários na forma de uma meningoencefalite (Bennett e Holtzman, 2005, *Neurology*, 64, 10-12).

A meningoencefalite foi caracterizada por neuroinflamação e infiltração de células T no cérebro. Presumidamente, isto foi devido a uma resposta imunitária de célula T induzida por injecção de A (1-42) como antigénio. Não seria de esperar uma resposta imunitária como esta após imunização passiva. Até hoje, não existem ainda dados clínicos disponíveis com referência a isto. Contudo, com referência a uma tal abordagem passiva à imunização, foram expressas preocupações acerca do perfil de efeitos secundários em virtude de estudos pré-clínicos em ratinhos APP23 muito idosos que receberam um anticorpo direccionado contra um epítopo N-terminal de A (1-42) uma vez por semana durante 5 meses. Estes ratinhos apresentaram um aumento no número e gravidade de micro-hemorragias, comparado com animais de controlo tratados com solução salina (Pfeifer *et al.*, 2002, *Science*, 298, 1379). Um aumento comparável de micro-hemorragias foi também descrito em ratinhos Tg2576 e PDAPP muito idosos (> 24 meses) (Racke *et al.*, 2005, *J Neurosci.*, 25, 629-636; Wilcock *et al.* 2004, *J. Neuroinflammation*, 1(1):24; De Mattes *et al.*, 2004, *Neurobiol. Aging* 25(S2):577). Em ambas as estirpes de ratinhos, a injecção do anticorpo levou a um aumento significativo de micro-hemorragias. Ao contrário, um anticorpo direccionado contra a região central do péptido A (1-42) não induziu micro-hemorragias (de Mattos *et al.*, supra). A ausência de indução de micro-hemorragias foi associada a um tratamento com anticorpos que não se ligam a péptido A agregado na forma de CAA (Racke *et al.*, J *Neurosci*, 25, 629-636). Mas, o mecanismo exacto que leva a micro-hemorragias em ratinhos transgénicos para APP não foi compreendido. Presumidamente, a angiopatia de amilóide cerebral (CAA) induz, ou pelo menos agrava, hemorragias cerebrais. A CAA está presente em quase todo cérebro com DA doença de Alzheimer e cerca de 20% dos casos são considerados "CAA grave". Portanto, a imunização passiva deverá evitar micro-hemorragias pela selecção de um anticorpo que reconhece a região central ou carboxi-terminal do péptido A .

WO2004/067561 descreve oligómeros A (1-42) estáveis (globulómeros A (1-42)) e anticorpos direccionados especificamente contra os globulómeros. A digestão com proteases não específicas mostra que o globulómero A pode

ser digerido começando com o terminal N hidrófilo protuberante da estrutura do núcleo globular (Barghorn *et al.*, 2005, *J Neurochem.*, 95, 834-847). Tais globulómeros A truncados no terminal N (globulómeros (A (12-42) e A (20-42) representam a unidade estrutural básica destes A oligoméricos. Constituem um antigénio muito potente para imunização activa de coelhos e ratinhos, levando a altos títulos de anticorpos (WO2004/067561). O suposto papel patológico de formas de A truncadas no terminal N *in vivo* foi sugerido por diversos relatos recentes da sua existência em cérebros com DA (Sergeant *et al.*, 2003, *J Neurochem.*, 85, 1581-1591; Thal *et al.*, 1999, *J Neuropathol. Exp Neurol*, 58, 210-216). Durante digestão *in vivo*, certas proteases encontradas no cérebro, por exemplo, enzima de degradação de insulina (IDE) ou neprilisina (NEP 24.11), podem estar envolvidas (Selkoe, 2001, *Neuron*, 32, 177-180).

Foi um objectivo da presente invenção proporcionar anticorpos direccionados contra globulómeros A que medeiam o desempenho cognitivo de um paciente em imunoterapia, ao mesmo tempo que reagindo apenas com uma pequena porção da quantidade total de péptido A no cérebro. Espera-se que isto previna um distúrbio substancial do equilíbrio de A cerebral e leve a menores efeitos secundários. (Por exemplo, uma redução terapeuticamente questionável de volume cerebral foi observada no estudo de imunização activa com péptidos A em condição fibrilar de agregação (ensaio da ELAN com AN1792). Além disso, neste ensaio, foram observados efeitos secundários graves na forma de uma meningoencefalite.

A presente invenção resolve este problema, proporcionando anticorpos específicos de globulómeros que possuem alta afinidade para com formas truncadas de globulómeros A . Estes anticorpos são capazes de discriminar não apenas outras formas de péptidos A , particularmente monómeros e fibrilhas, mas também formas não truncadas de globulómeros A .

Assim, a presente invenção refere-se a um anticorpo tendo uma afinidade de ligação para com um globulómero A (20-42) que é pelo menos 10 vezes maior que a afinidade de ligação deste anticorpo para com um globulómero A (1-42).

De acordo com uma outra concretização, os anticorpos da presente invenção têm também uma afinidade de ligação para com um globulómero A (20-42) que é maior que a afinidade de ligação deste anticorpo para com um globulómero A (12-42).

De acordo com uma concretização particular, a invenção refere-se assim a anticorpos monoclonais tendo uma afinidade de ligação para com o globulómero A (20-42) que é maior que a afinidade de ligação do anticorpo tanto para com o globulómero A (1-42) como para com o globulómero A (1-43).

O termo "A (X-Y)" refere-se aqui à sequência de aminoácidos desde a posição de aminoácido x até à posição de aminoácido Y da proteína -amilóide humana, incluindo tanto x como Y, em particular, à sequência de aminoácidos desde a posição de aminoácido x até à posição de aminoácido Y da sequência de aminoácidos DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGGVV IAT (correspondente às posições de aminoácido 1 a 43) ou quaisquer de suas variantes de ocorrência natural, em particular aquelas com pelo menos uma mutação seleccionada do grupo que consiste em A2T, H6R, D7N, A21G ("*Flemish*"), E22G ("Ártico"), E22Q ("*Dutch*"), E22K ("*Italian*"), D23N ("*Iowa*"), A42T e A42V, em que os números são relativos ao início do péptido A , incluindo tanto a posição x como a posição Y, ou uma sequência com até três substituições de aminoácidos adicionais, nenhuma das quais podendo impedir a formação do globulómero, preferivelmente sem nenhuma substituição de aminoácido adicional na porção desde o aminoácido 12 ou X, o que corresponder ao número maior, até ao aminoácido 42 ou Y, o que corresponder ao número menor, mais preferivelmente sem nenhuma substituição de aminoácido adicional na porção desde o aminoácido 20 ou X, o que corresponder ao número maior, até ao aminoácido 42 ou Y, o que corresponder ao número menor, e ainda mais preferivelmente sem nenhuma substituição de aminoácido adicional na porção desde o aminoácido 20 ou X, o que corresponder ao número maior, até ao aminoácido 40 ou Y, o que corresponder ao número menor, sendo aqui uma substituição de aminoácido "adicional" qualquer desvio à sequência canónica que não se encontre na natureza.

Mais especificamente, o termo "A (1-42)" refere-se aqui à sequência de aminoácidos da posição de aminoácido 1 até à

posição de aminoácido 42 da proteína -amilóide humana, incluindo tanto 1 como 42, em particular, à sequência de aminoácidos DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGGVV IA, ou quaisquer das suas variantes de ocorrência natural, em particular aquelas com pelo menos uma mutação seleccionada do grupo que consiste em A2T, H6R, D7N, A21G ("*Flemish*"), E22G ("*Arctic*"), E22Q ("*Dutch*"), E22K ("*Italian*"), D23N ("*Iowa*"), A42T e A42V, em que os números são relativos ao início do péptido A , incluindo tanto 1 como 42, ou uma sequência com até três substituições de aminoácidos adicionais, nenhuma das quais podendo impedir a formação do globulómero, preferivelmente sem nenhuma substituição de aminoácido adicional na porção do aminoácido 20 até ao aminoácido 42. Da mesma forma, o termo "A (1-40)" refere-se aqui à sequência de aminoácidos desde a posição de aminoácido 1 até à posição de aminoácido 40 da proteína -amilóide humana, incluindo tanto 1 como 40, em particular, à sequência de aminoácidos DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGGVV ou quaisquer de suas variantes de ocorrência natural, em particular aquelas com pelo menos uma mutação seleccionada do grupo que consiste em A2T, H6R, D7N, A21G ("*Flemish*"), E22G ("*Arctic*"), E22Q ("*Dutch*"), E22K ("*Italian*"), e D23N ("*Iowa*"), em que os números são relativos ao início do péptido A , incluindo tanto 1 como 40, ou uma sequência com até três substituições de aminoácidos adicionais, nenhuma das quais podendo impedir a formação do globulómero, preferivelmente sem nenhuma substituição de aminoácido adicional na porção do aminoácido 20 até ao aminoácido 40.

Mais especificamente, o termo "A (12-42)" refere-se aqui à sequência de aminoácidos desde a posição de aminoácido 12 até à posição de aminoácido 42 da proteína -amilóide humana, incluindo tanto 12 como 42, em particular, à sequência de aminoácidos VHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGGVV IA ou quaisquer de suas variantes de ocorrência natural, em particular aquelas com pelo menos uma mutação seleccionada do grupo que consiste em A21G ("*Flemish*"), E22G ("*Arctic*"), E22Q ("*Dutch*"), E22K ("*Italian*"), D23N ("*Iowa*"), A42T e A42V, em que os números são relativos ao início do péptido A , incluindo tanto 12 como 42, ou uma sequência com até três substituições de aminoácidos adicionais, nenhuma das quais podendo impedir a formação do globulómero,

preferivelmente sem nenhuma substituição de aminoácido adicional na porção do aminoácido 20 até ao aminoácido 42.

Mais especificamente, o termo "A (20-42)" refere-se aqui à sequência de aminoácidos desde a posição de aminoácido 20 até à posição de aminoácido 42 da proteína -amilóide humana, incluindo tanto 20 como 42, em particular, à sequência de aminoácidos F AEDVGSNKGA IIGLMVGGVV IA ou quaisquer de suas variantes de ocorrência natural, em particular aquelas com pelo menos uma mutação seleccionada do grupo que consiste em A21G ("*Flemish*"), E22G ("*Arctic*"), E22Q ("*Dutch*"), E22K ("*Italian*"), D23N ("*Iowa*"), A42T e A42V, em que os números são relativos ao início do péptido A , incluindo tanto 20 como 42, ou uma sequência com até três substituições de aminoácidos adicionais, nenhuma das quais podendo impedir a formação do globulómero, preferivelmente sem nenhuma substituição de aminoácido adicional.

O termo "globulómero A (X-Y)" (oligómero globular A (X-Y)) refere-se aqui a uma associação não covalente, globular, solúvel, de péptidos A (X-Y) como definidos acima, possuindo homogeneidade e características físicas distintas. De acordo com um aspecto, globulómeros A (X-Y) são associações oligoméricas estáveis, não fibrilares, de péptidos A (X-Y) que são obteníveis por incubação com detergentes aniónicos. Ao contrário dos monómeros e das fibrilhas, estes globulómeros são caracterizados por números definidos de subunidades da associação (por exemplo, formas de associações precoces, n=4-6, "oligómeros A", e formas de associações tardias, n=12-14, "oligómeros B", como descrito em WO2004/067561). Os globulómeros têm uma estrutura tridimensional do tipo globular ("glóbulo fundido", ver Barghorn *et al.*, 2005, *J Neurochem.*, 95, 834-847). Podem ser adicionalmente caracterizados por uma ou mais das seguintes características:

- susceptibilidade à clivagem dos aminoácidos N-terminais X-23 por proteases promíscuas (tais como termolisina ou endoproteinase GluC) produzindo formas truncadas de globulómeros;

- não acessibilidade dos aminoácidos C-terminais 24-Y a proteases promíscuas e anticorpos;

- formas truncadas desses globulómeros mantêm a estrutura tridimensional nulcear dos ditos globulómeros com uma melhor acessibilidade ao epítopo do núcleo A (20-Y) na sua conformação de globulómero.

De acordo com a invenção e, em particular, com o propósito de avaliar as afinidades de ligação dos anticorpos da presente invenção, o termo "globulómero A (X-Y)" refere-se aqui em particular a um produto que é obtenível por um processo descrito em WO 2004/067561.

O dito processo compreende desdobrar um péptido A (X-Y) natural, recombinante ou sintético, ou um seu derivado; expor o péptido A (X-Y) pelo menos parcialmente desdobrado, ou o seu derivado, a um detergente, reduzir a acção do detergente e continuar a incubação.

Com o propósito de desdobrar o péptido, podem deixar-se actuar sobre a proteína agentes que quebram ligações de hidrogénio tais como, por exemplo, hexafluoroisopropanol (HFIP). Tempos de acção de poucos minutos, por exemplo, cerca de 10 a 60 minutos, são suficientes quando a temperatura de acção é de cerca de 20 a 50°C e, em particular, cerca de 35 a 40°C. A dissolução subsequente do resíduo evaporado até à secura, preferivelmente na forma concentrada, em solventes orgânicos adequados miscíveis com tampões aquosos, tais como, por exemplo, dimetilsulfóxido (DMSO), resulta numa suspensão do péptido pelo menos parcialmente desdobrado, ou do seu derivado, que pode ser usada subsequentemente. Se exigido, a suspensão de reserva pode ser armazenada a baixa temperatura, por exemplo, a cerca de -20°C, por um período temporário.

Alternativamente, o péptido ou o seu derivado podem ser tomados em solução ligeiramente ácida, preferivelmente aquosa, por exemplo, uma solução de HCl aquosa cerca de 10 mM. Após um tempo de incubação geralmente de poucos minutos, os componentes insolúveis são removidos por centrifugação. Poucos minutos a 10 000 g são conveniente. Estas etapas do método são preferivelmente realizadas à

temperatura ambiente, isto é, a uma temperatura na gama de 20 a 30°C. O sobrenadante obtido após centrifugação contém o péptido A (X-Y) ou o seu derivado e pode ser armazenado a baixa temperatura, por exemplo, a cerca de -20°C, por um período temporário.

A exposição seguinte a um detergente refere-se à oligomerização do péptido ou do seu derivado para dar um tipo intermediário de oligómeros (em WO 2004/067561 referidos como oligómeros A). Com este propósito, deixa-se actuar um detergente sobre o péptido pelo menos parcialmente desdobrado, ou o seu derivado, até que seja produzido oligómero intermediário suficiente.

É dada preferência ao uso de detergentes iónicos, em particular detergentes aniónicos.

De acordo com uma concretização particular, é usado um detergente de fórmula (I):

R-X,

em que

o radical R é alquilo não ramificado ou ramificado tendo de 6 a 20 e preferivelmente 10 a 14 átomos de carbono ou alcenilo não ramificado ou ramificado tendo de 6 a 20 e preferivelmente 10 a 14 átomos de carbono,

o radical x é um grupo ácido, ou um seu sal, sendo x preferivelmente seleccionado entre

$-COO^-M^+$, $-SO_3^-M^+$, e especialmente

$-OSO_3^-M^+$ e M^+ é um catião de hidrogénio ou um catião inorgânico ou orgânico preferivelmente seleccionado entre catiões de metais alcalinos e metais alcalino-terrosos e catiões de amónio.

São vantajosos detergentes de fórmula (I) em que R é alquilo não ramificado de que os radicais alquilo-1 devem ser mencionados em particular. É dada particular preferência ao dodecilsulfato de sódio (SDS). Ácido láurico e ácido oleico podem também ser usados vantajosamente. O sal de sódio do detergente lauroílsarcosina (também conhecido

como sarcosilo NL-30 ou Gardol®) é também particularmente vantajoso.

O tempo de acção do detergente em particular depende se - e, em caso afirmativo, até que ponto - o péptido ou o seu derivado submetido a oligomerização foi desdobrado. Se, de acordo com a etapa de desdobramento, o péptido ou o seu derivado foi tratado de antemão com um agente que quebra ligações de hidrogénio, isto é, em particular com hexafluoroisopropanol, tempos de acção na gama de poucas horas, vantajosamente de cerca de 1 a 20 e em particular de cerca de 2 a 10 horas, são suficientes quando a temperatura de acção é de cerca de 20 a 50°C e em particular cerca de 35 a 40°C. Se um péptido menos desdobrado ou essencialmente não desdobrado, ou um seu derivado, for o ponto de partida, tempos de acção correspondentemente mais longos são convenientes. Se o péptido ou o seu derivado tiverem sido pré-tratados, por exemplo, de acordo com o procedimento indicado acima como uma alternativa ao tratamento com HFIP, ou se o dito péptido ou o seu derivado forem directamente submetidos a oligomerização, tempos de acção na gama de cerca de 5 a 30 horas e em particular cerca de 10 a 20 horas são suficientes quando a temperatura de acção é de cerca de 20 a 50°C e em particular cerca de 35 a 40°C. Após incubação, os componentes insolúveis são vantajosamente removidos por centrifugação. Poucos minutos a 10 000 g são convenientes.

A concentração de detergente a ser escolhida depende do detergente usado. Se for usado SDS, mostra-se conveniente uma concentração na gama de 0,01 a 1% em peso, preferivelmente de 0,05 a 0,5% em peso, por exemplo, de cerca de 0,2% em peso. Se for usado ácido láurico ou ácido oleico, são convenientes concentrações ligeiramente maiores, por exemplo, numa gama de 0,05 a 2% em peso, preferivelmente de 0,1 a 0,5% em peso, por exemplo, de cerca de 0,5% em peso.

A acção do detergente deverá ocorrer a uma concentração salina aproximadamente na gama fisiológica. Assim, em particular concentrações de NaCl na gama de 50 a 500 mM, preferivelmente de 100 a 200 mM e particularmente a cerca de 140 mM, são convenientes.

A redução subsequente da acção do detergente e a continuação da incubação referem-se a uma oligomerização adicional para dar o globulómero A (X-Y) da invenção(em WO 2004/067561 referido como oligómeros B). Uma vez que a composição obtida da etapa precedente contém regularmente detergente e uma concentração salina na gama fisiológica, é então conveniente reduzir a acção do detergente e, preferivelmente, também a concentração salina. Isto pode ser realizado reduzindo a concentração de detergente e de sal, por exemplo, diluindo apropriadamente com água ou um tampão de baixa concentração salina, por exemplo, Tris-HCl, pH 7,3. Factores de diluição na gama de cerca de 2 a 10, vantajosamente na gama de cerca de 3 a 8 e em particular de cerca de 4 mostraram-se adequados. A redução na acção do detergente também pode ser obtida adicionando substâncias que podem neutralizar a dita acção do detergente. Exemplos desses incluem substâncias capazes de complexar os detergentes, como substâncias capazes de estabilizar células no decorrer de medidas de purificação e extracção, por exemplo, copolímeros de blocos EO/PO particulares, em particular o copolímero de blocos com a denominação comercial Pluronic® F68. Alquilfenóis alcoxilados e, em particular, etoxilados tais como os t-octilfenóis etoxilados da série Triton® X, em particular o Triton® X100, o 3-(3-colamidopropildimetilamónio)-1-propanossulfonato (CHAPS®) ou ésteres gordos de sorbitano alcoxilados e, em particular, etoxilados, tais como os da série Tween®, em particular Tween® 20, em gamas de concentração em torno, ou acima, da concentração micelar crítica particular, podem ser igualmente usados.

Subsequentemente, a solução é incubada até que seja produzido suficiente globulómero A (X-Y) da invenção. Tempos de acção na gama de várias horas, preferivelmente na gama de cerca de 10 a 30 horas e em particular na gama de cerca de 15 a 25 horas são suficientes quando a temperatura de acção é de cerca de 20 a 50°C e em particular cerca de 35 a 40°C. A solução pode em seguida ser concentrada e os possíveis resíduos podem ser removidos por centrifugação. Aqui também, poucos minutos a 10 000 g mostram-se convenientes. O sobrenadante obtido após centrifugação contém um globulómero A (X-Y) da invenção.

Um globulómero A (X-Y) da invenção pode ser finalmente recuperado de uma maneira conhecida *per se*, por exemplo, por ultrafiltração, diálise, precipitação ou centrifugação.

É adicionalmente preferido que a separação electroforética dos globulómeros A (X-Y) em condições desnaturantes, por exemplo, por SDS-PAGE, produza uma banda dupla (por exemplo, com um peso molecular aparente de 38/48 kDa para A (1-42)), e prefere-se especialmente que, mediante tratamento com glutardialdeído dos globulómeros antes da separação, essas duas bandas se fundam numa. Prefere-se também que a cromatografia de exclusão por tamanho dos globulómeros resulte num pico único (por exemplo, correspondente a um peso molecular de aproximadamente 100 kDa para globulómero A (1-42) ou de aproximadamente 60 kDa para globulómero A (1-42) reticulado com glutardialdeído, respectivamente).

Começando pelo péptido A (1-42), pelo péptido A (12-42) e pelo péptido A (20-42), os ditos processos são em particular adequados para obter globulómeros A (1-42), globulómeros A (12-42) e globulómeros A (20-42).

Numa concretização particular da invenção, os globulómeros A (X-Y), em que x é seleccionado do grupo que consiste nos números 2.. 24 e Y é como definido acima, são aqueles que são obteníveis por truncagem de globulómeros A (1-Y) em formas mais curtas, em que x é seleccionado do grupo que consiste nos números 2.. 24, sendo x preferivelmente sendo 20 ou 12, e Y é como definido acima, que pode ser obtida por tratamento com proteases apropriadas. Por exemplo, um globulómero A (20-42) pode ser obtido submetendo um globulómero A (1-42) a proteólise por termolisina, e um globulómero A (12-42) pode ser obtido submetendo um globulómero A (1-42) a proteólise pela endoproteinase GluC. Quando o grau desejado de proteólise é atingido, a protease é inactivada de uma maneira genericamente conhecida. Os globulómeros resultantes podem em seguida ser isolados seguindo os procedimentos já descritos aqui e, se exigido, processados adicionalmente por etapas de tratamento e purificação posteriores. Uma descrição detalhada dos ditos processos é divulgada em WO 2004/067561.

Para os propósitos da presente invenção, um globulómero A (1-42) é em particular o globulómero A (1-42) como aqui descrito no exemplo 1a; um globulómero A (20-42) é em particular o globulómero A (20-42) como aqui descrito nos exemplos 1c, e um globulómero A (12-42) é em particular o globulómero A (12-42) como aqui descrito nos exemplos 1d.

Preferivelmente, o globulómero apresenta afinidade para com células neuronais. Preferivelmente, o globulómero também exibe efeitos neuromoduladores.

De acordo com um outro aspecto da invenção, o globulómero consiste em 11 a 16, e o mais preferivelmente, 12 a 14 péptidos A (X-Y).

De acordo com um outro aspecto da invenção, o termo "globulómero A (X-Y)" refere-se aqui a um globulómero consistindo essencialmente em subunidades A (X-Y), onde é preferido que, em média, pelo menos 11 de 12 subunidades sejam do tipo A (X-Y), mais preferível que menos que 10% dos globulómeros compreendam quaisquer péptidos que não A (X-Y), e o mais preferido que o teor de péptidos que não A (X-Y) seja abaixo do limite de detecção.

Mais especificamente, o termo "globulómero A (1-42)" refere-se aqui a um globulómero consistindo essencialmente em unidades A (1-42) como definido acima; o termo "globulómero A (12-42)" refere-se aqui a um globulómero consistindo essencialmente em unidades A (12-42) como definido acima; e o termo "globulómero A (20-42)" refere-se aqui a um globulómero consistindo essencialmente em unidades A (20-42) como definido acima.

O termo "globulómero A (X-Y) reticulado" refere-se aqui a uma molécula obtenível a partir de um globulómero A (X-Y) como descrito acima por reticulação, preferivelmente reticulação química, mais preferivelmente reticulação com aldeído, o mais preferivelmente reticulação com glutardialdeído, das unidades constituintes do globulómero. Num outro aspecto da invenção, um globulómero reticulado é essencialmente um globulómero em que as unidades estão, pelo menos parcialmente, unidas por ligações covalentes, em vez de serem mantidas juntas apenas por interacções não covalentes. Para os propósitos da presente invenção, um

globulómero A (1-42) reticulado é em particular o oligómero A (1-42) reticulado como aqui descrito no exemplo 1b.

O termo "derivado de globulómero A (X-Y)" refere-se aqui em particular a um globulómero que está marcado por ligação covalente a um grupo que facilita a detecção, preferivelmente um fluoróforo, por exemplo, isotiocianato de fluoresceína, ficoeritrina, proteína fluorescente de *Aequorea victoria*, proteína fluorescente de *Dictyosoma* ou qualquer sua combinação ou seu derivado activos em termos de fluorescência; um cromóforo; um quimioluminóforo, por exemplo, luciferase, preferivelmente luciferase de *Photinus pyralis*, luciferase de *Vibrio fischeri*, ou qualquer sua combinação ou seu derivado activos em termos de quimioluminescência; um grupo enzimaticamente activo, por exemplo, peroxidase, por exemplo, peroxidase do rábano-silvestre, ou qualquer seu derivado enzimaticamente activo; um grupo denso em electrões, por exemplo, um grupo contendo um metal pesado, por exemplo, um grupo contendo ouro; um hapteno, por exemplo, um hapteno derivado de fenol; uma estrutura fortemente antigénica, por exemplo, uma sequência peptídica que se prevê ser antigénica, por exemplo, que se prevê antigénica pelo algoritmo de Kolaskar e Tongaonkar; um aptâmero para uma outra molécula; um grupo quelante, por exemplo, hexa-histidinilo; uma estrutura de proteína natural ou derivada da natureza que medeia outras interacções proteína-proteína específicas, por exemplo, um membro do par fos/jun; um grupo magnético, por exemplo, um grupo ferromagnético; ou um grupo radioactivo, por exemplo, um grupo compreendendo ^{1}H, ^{14}C ^{32}P, ^{35}S ou ^{125}I ou qualquer sua combinação; ou a um globulómero sinalizado por ligação covalente ou por interacção não covalente de alta afinidade, preferivelmente ligação covalente, a um grupo que facilita a inactivação, o sequestro, a degradação e/ou a precipitação, preferivelmente sinalizado com um grupo que promove a degradação *in vivo*, mais preferivelmente com ubiquitina, sendo particularmente preferido que este oligómero sinalizado seja associado *in vivo*; ou a um globulómero modificado por qualquer combinação dos anteriores. Estes grupos de marcação e sinalização e métodos para os ligar às proteínas são conhecidos na técnica. A marcação e/ou a sinalização podem ser realizadas antes, durante ou após a globulomerização. Num outro aspecto da invenção, um derivado de globulómero é uma

molécula obtenível a partir de um globulómero através de uma reacção de marcação e/ou sinalização.

Correspondentemente, o termo "derivado de monómero A (X-Y)" refere-se aqui em particular a um monómero A que é marcado ou sinalizado como descrito para o globulómero.

Apropriadamente, o anticorpo da presente invenção liga-se a um globulómero A (20-42) com uma $_{D}K$ na gama de 1×10^{-6} M a 1×10^{-12} M. Preferivelmente, o anticorpo liga-se a um globulómero A (20-42) com alta afinidade, por exemplo, com uma K_D de 1×10^{-7} M ou maior afinidade, por exemplo, com uma K_D de 3×10^{-8} M ou maior afinidade, com uma K_D de 1×10^{-9} M ou maior afinidade, por exemplo, com uma K_D de 3×10^{-9} M ou maior afinidade, com uma K_D de 1×10^{-9} M ou maior afinidade, por exemplo, com uma K_D de 3×10^{-10} M ou maior afinidade, com uma K_D de 1×10^{-10} M ou maior afinidade, por exemplo, com uma K_D de 3×10^{-11} M ou maior afinidade, ou com uma K_D de 1×10^{-11} M ou maior afinidade.

O termo "maior afinidade" refere-se aqui a um grau de interacção onde o equilíbrio entre anticorpo não ligado e globulómero não ligado, por um lado, e complexo anticorpo-globulómero, por outro, é ainda mais a favor do complexo anticorpo-globulómero. Da mesma forma, o termo "menor afinidade" refere-se aqui a um grau de interacção onde o equilíbrio entre anticorpo não ligado e globulómero não ligado, por um lado, e complexo anticorpo-globulómero, por outro, é ainda mais a favor do anticorpo não ligado e globulómero não ligado. O termo "maior afinidade" é sinónimo do termo "afinidade mais alta" e o termo "menor afinidade" é sinónimo do termo "afinidade mais baixa".

De acordo com uma concretização particular, a invenção refere-se a um anticorpo que se liga ao globulómero A (20-42) com uma $_{D}K$ na gama de 1×10^{-6} M a 1×10^{-12} M, ao globulómero A (1-42) com uma $_{D}K$ de 10^{-12} M ou menor afinidade, a afinidade de ligação para com o globulómero A (20-42) sendo maior que a afinidade de ligação para com o globulómero A (1-42).

Prefere-se que a afinidade de ligação do anticorpo da presente invenção para com o globulómero A (20-42) seja pelo menos 2 vezes, por exemplo, pelo menos 3 vezes ou pelo menos

5 vezes, preferivelmente pelo menos 10 vezes, por exemplo, pelo menos 20 vezes, pelo menos 30 vezes ou pelo menos 50 vezes, mais preferivelmente pelo menos 100 vezes, por exemplo, pelo menos 200 vezes, pelo menos 300 vezes ou pelo menos 500 vezes, e ainda mais preferivelmente pelo menos 1000 vezes, por exemplo, pelo menos 2000 vezes, pelo menos 3000 vezes ou pelo menos 5000 vezes, ainda mais preferivelmente pelo menos 10 000 vezes, por exemplo, pelo menos 20 000 vezes, pelo menos 30 000 ou pelo menos 50 000 vezes, e ainda mais preferivelmente pelo menos 100 000 vezes maior que a afinidade de ligação do anticorpo para com o globulómero A (1-42).

De acordo com uma concretização particular, a invenção refere-se a um anticorpo que se liga ao globulómero A (12-42) com uma $_{D}K$ de 10^{-12} M ou menor afinidade, a afinidade de ligação para com o globulómero A (20-42) sendo maior que a afinidade de ligação para com o globulómero A (2-42).

Prefere-se também que a afinidade de ligação do anticorpo da presente invenção para com o globulómero A (20-42) seja pelo menos 2 vezes, por exemplo, pelo menos 3 vezes ou pelo menos 5 vezes, preferivelmente pelo menos 10 vezes, por exemplo, pelo menos 20 vezes, pelo menos 30 vezes ou pelo menos 50 vezes, mais preferivelmente pelo menos 100 vezes, por exemplo, pelo menos 200 vezes, pelo menos 300 vezes ou pelo menos 500 vezes, e ainda mais preferivelmente pelo menos 1000 vezes, por exemplo, pelo menos 2000 vezes, pelo menos 3000 vezes ou pelo menos 5000 vezes, ainda mais preferivelmente pelo menos 10 000 vezes, por exemplo, pelo menos 20 000 vezes, pelo menos 30 000 ou pelo menos 50 000 vezes, e ainda mais preferivelmente pelo menos 100 000 vezes, maior que a afinidade de ligação do anticorpo para com o globulómero A (12-42).

Preferivelmente, os anticorpos da presente invenção ligam-se a pelo menos um globulómero A , como definido acima, e têm uma afinidade comparativamente menor para com pelo menos uma forma não globulomérica de A .

Os anticorpos da presente invenção tendo uma afinidade para com pelo menos uma forma não globulomérica de A

comparativamente menor do que para com pelo menos um globulómero A incluem anticorpos tendo uma afinidade de ligação para com o globulómero A (20-42) que é maior do que para com um monómero A (1-42). Adicionalmente, prefere-se que, alternativa ou adicionalmente, a afinidade de ligação do anticorpo para com o globulómero A (20-42) seja maior do que para com um monómero A (1-40).

Numa concretização preferida da invenção, a afinidade do anticorpo para com o globulómero A (20-42) é maior que a sua afinidade tanto para com o monómero A (1-40) como para com o monómero A (1-42).

O termo "monómero A (X-Y)" refere-se aqui à forma isolada do péptido A (X-Y), preferivelmente uma forma do péptido A (X-Y) que não está comprometida em interacções essencialmente não covalentes com outros péptidos A . Na prática, o monómero A (X-Y) é geralmente proporcionado na forma de uma solução aquosa. Numa concretização particularmente preferida da invenção, a solução aquosa de monómero contém 0,05% a 0,2%, mais preferivelmente cerca de 0,1% de NH_4OH. Numa outra concretização particularmente preferida da invenção, a solução aquosa de monómero contém 0,05% a 0,2%, mais preferivelmente cerca de NaOH a 0,1%. Quando usado (por exemplo, para determinar as afinidades de ligação dos anticorpos da presente invenção), pode ser conveniente diluir a dita solução de uma maneira apropriada. Adicionalmente, é geralmente conveniente usar a dita solução em 2 horas, em particular em 1 hora, e especialmente em 30 minutos após sua preparação.

Mais especificamente, o termo "monómero A (1-40)" refere-se aqui a uma preparação de monómero A (1-40) como aqui descrito no exemplo 2, e o termo "monómero A (1-42)" refere-se aqui a uma preparação de A (1-42) como aqui descrito no exemplo 2.

Apropriadamente, o anticorpo da presente invenção liga-se a um ou, mais preferivelmente, a ambos os monómeros com baixa afinidade, ainda mais preferivelmente com uma K_D de 1×10^{-8} M ou menor afinidade, por exemplo, com uma K_D de 3×10^{-8} M ou menor afinidade, com uma K_D de 1×10^{-7} M ou menor afinidade, por exemplo, com uma K_D de 3×10^{-7} M ou menor afinidade, ou com uma K_D de 1×10^{-6} M ou menor

afinidade, por exemplo, com uma K_D de 3×10^{-6} M ou menor afinidade, ou com uma K_D de 1×10^{-5} M ou menor afinidade.

Prefere-se especialmente que a afinidade de ligação do anticorpo da presente invenção para com o globulómero A (20-42) seja pelo menos 2 vezes, por exemplo, pelo menos 3 vezes ou pelo menos 5 vezes, preferivelmente pelo menos 10 vezes, por exemplo, pelo menos 20 vezes, pelo menos 30 vezes ou pelo menos 50 vezes, mais preferivelmente pelo menos 100 vezes, por exemplo, pelo menos 200 vezes, pelo menos 300 vezes ou pelo menos 500 vezes, e ainda mais preferivelmente pelo menos 1000 vezes, por exemplo, pelo menos 2000 vezes, pelo menos 3000 vezes ou pelo menos 5000 vezes, ainda mais preferivelmente pelo menos 10 000 vezes, por exemplo, pelo menos 20 000 vezes, pelo menos 30 000 ou pelo menos 50 000 vezes, e ainda mais preferivelmente pelo menos 100 000 vezes, maior que a afinidade de ligação do anticorpo para com um ou, mais preferivelmente, ambos os monómeros.

Os anticorpos da presente invenção tendo uma afinidade para com pelo menos uma forma não globulomérica de A comparativamente menor do que para com pelo menos um globulómero A incluem ainda anticorpos tendo uma afinidade de ligação para com o globulómero A (20-42) que é maior do que para com fibrilhas de A (1-42). Adicionalmente, prefere-se que, alternativa ou adicionalmente, a afinidade de ligação do anticorpo para com o globulómero A (20-42) seja maior do que para com fibrilhas de A (1-40).

O termo "fibrilha" refere-se aqui a uma estrutura molecular que compreende associações de péptidos A (X-Y) individuais, associados não covalentemente, que exibe estrutura fibrilar no microscópio electrónico, que liga vermelho do Congo e em seguida exibe bi-refringência sob luz polarizada e cujo padrão de difracção de raios x é uma estrutura cruzada.

Num outro aspecto da invenção, uma fibrilha é uma estrutura molecular obtenível por um processo que compreende a agregação polimérica auto-induzida de um péptido A adequado na ausência de detergentes, por exemplo, em HCl 0,1 M, levando à formação de agregados de mais que 24, preferivelmente mais que 100 unidades. Este processo é bem

conhecido na técnica. Apropriadamente, fibrilhas de A (X-Y) são usadas na forma de uma solução aquosa. Numa concretização particularmente preferida da invenção, a solução aquosa de fibrilhas é preparada dissolvendo o péptido A em NaOH a 0,1%, diluindo-o 1:4 com NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, seguindo-se reajustamento do pH a 7,4, incubando a solução a 37°C durante 20 h, seguido por centrifugação a 10 000 g durante 10 min e ressuspensão em NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4.

O termo "fibrilha de A (X-Y)" refere-se aqui a uma fibrilha consistindo essencialmente em subunidades A (X-Y), onde é preferido que, em média, pelo menos 90% das subunidades sejam do tipo A (X-Y), mais preferido que pelo menos 98% das subunidades sejam do tipo A (X-Y), e o mais preferido que o teor de péptidos que não A (X-Y) seja abaixo do limiar de detecção.

Mais especificamente, o termo "fibrilha de A (1-42)" refere-se aqui a uma preparação de fibrilhas de A (1-42) como aqui descrito no exemplo 3.

Apropriadamente, o anticorpo da presente invenção liga-se a uma ou, mais preferivelmente, ambas as fibrilhas, com baixa afinidade, ainda mais preferivelmente com uma K_D de 1×10^{-8} M ou menor afinidade, por exemplo, com uma K_D de 3×10^{-8} M ou menor afinidade, com uma K_D de 1×10^{-7} M ou menor afinidade, por exemplo, com uma K_D de 3×10^{-7} M ou menor afinidade, ou com uma K_D de 1×10^{-6} M ou menor afinidade, por exemplo, com uma K_D de 3×10^{-5} M ou menor afinidade, ou com uma K_D de 1×10^{-5} M ou menor afinidade.

Prefere-se especialmente que a afinidade de ligação do anticorpo da presente invenção para com o globulómero A (20-42) seja pelo menos 2 vezes, por exemplo, pelo menos 3 vezes ou pelo menos 5 vezes, preferivelmente pelo menos 10 vezes, por exemplo, pelo menos 20 vezes, pelo menos 30 vezes ou pelo menos 50 vezes, mais preferivelmente pelo menos 100 vezes, por exemplo, pelo menos 200 vezes, pelo menos 300 vezes ou pelo menos 500 vezes, e ainda mais preferivelmente pelo menos 1000 vezes, por exemplo, pelo menos 2000 vezes, pelo menos 3000 vezes ou pelo menos 5000 vezes, ainda mais preferivelmente pelo menos 10 000 vezes, por exemplo, pelo menos 20 000 vezes, pelo

menos 30 000 ou pelo menos 50 000 vezes, e o mais preferivelmente pelo menos 100 000 vezes, maior que a afinidade de ligação do anticorpo para com uma ou, mais preferivelmente, ambas fibrilhas.

De acordo com uma concretização particular, a invenção refere-se a anticorpos tendo um afinidade de ligação para com o globulómero A (20-42) que é maior que a sua afinidade de ligação tanto para com fibrilhas de A (1-40) como de A (1-42).

De acordo com uma concretização particularmente preferida, a presente invenção refere-se a anticorpos tendo uma afinidade comparativamente menor para com as formas de A monoméricas e fibrilares do que para com pelo menos um globulómero A , em particular o globulómero A (20-42). Estes anticorpos adiante são referidos como anticorpos específicos de globulómeros.

Os anticorpos da presente invenção incluem ainda anticorpos tendo uma afinidade de ligação para com o globulómero A (20-42) que é maior que para com um globulómero A (1-42) reticulado, em particular para com um globulómero A (1-42) reticulado com glutardialdeído, tal como que descrito aqui no exemplo 1b.

Numa concretização particularmente preferida da invenção, a afinidade de ligação do anticorpo para com o globulómero A (20-42) é pelo menos 2 vezes, por exemplo pelo menos 3 vezes ou pelo menos 5 vezes, preferivelmente pelo menos 10 vezes, por exemplo, pelo menos 20 vezes, pelo menos 30 vezes ou pelo menos 50 vezes, mais preferivelmente pelo menos 100 vezes, por exemplo, pelo menos 200 vezes, pelo menos 300 vezes ou pelo menos 500 vezes, e ainda mais preferivelmente pelo menos 1000 vezes, por exemplo, pelo menos 2000 vezes, pelo menos 3000 vezes ou pelo menos 5000 vezes, ainda mais preferivelmente pelo menos 10 000 vezes, por exemplo, pelo menos 20 000 vezes, pelo menos 30 000 ou pelo menos 50 000 vezes, e ainda mais preferivelmente pelo menos 100 000 vezes, maior que a afinidade de ligação do anticorpo para com globulómero A (1-42) reticulado.

Os anticorpos da presente invenção são preferivelmente isolados, em particular monoclonais e mais particularmente recombinantes.

A presente invenção também se refere a um anticorpo monoclonal (5F7) que é obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7241 na American Type Culture Collection.

A presente invenção também se refere a um anticorpo monoclonal (10F11) que é obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7239 na American Type Culture Collection.

A presente invenção também se refere a um anticorpo monoclonal (7C6) que é obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7240 na American Type Culture Collection.

A presente invenção também se refere a um anticorpo monoclonal (4B7) que é obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7242 na American Type Culture Collection.

A presente invenção também se refere a um anticorpo monoclonal (6A2) que é obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7409 na American Type Culture Collection.

A presente invenção também se refere a um anticorpo monoclonal (2F2) que é obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7408 na American Type Culture Collection.

A presente invenção também se refere a um anticorpo monoclonal (4D10) que é obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7405 na American Type Culture Collection.

A presente invenção também se refere a um anticorpo monoclonal (7E5) que é obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7809 na American Type Culture Collection.

A presente invenção também se refere a um anticorpo monoclonal (10C1) que é obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7810 na American Type Culture Collection.

A presente invenção também se refere a um anticorpo monoclonal (3B10) que é obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7851 na American Type Culture Collection.

Estes anticorpos da presente invenção, 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 e 3B10, são caracterizados por terem uma afinidade de ligação para com um globulómero A (20-42) que é maior que a afinidade de ligação do anticorpo para com um globulómero A (1-42).

A presente invenção também se refere a anticorpos tendo um perfil de ligação similar ao de qualquer um dos ditos anticorpos monoclonais, 5F7, 10F11, 7C6, 4B7 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 e 3B10. Deve-se entender que os anticorpos tendo um perfil de ligação similar ao de qualquer um dos ditos anticorpos monoclonais não estão limitados a anticorpos tendo uma afinidade de ligação para com um globulómero A (20-42) que é maior que a afinidade de ligação do anticorpo para com um globulómero A (1-42).

Anticorpos tendo um perfil de ligação similar ao de qualquer um dos ditos anticorpos monoclonais, 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 e 3B10, incluem anticorpos que se ligam ao mesmo epítopo que o anticorpo monoclonal 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 e 3B10.

Todos os anticorpos monoclonais do grupo que consiste em 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 e 3B10 ligam-se a um epítopo contido na gama de 20 e 42 da sequência de A , em particular na gama 20-30 da sequência de A . Sem vinculação a nenhuma teoria, acredita-se que o dito epítopo seja um epítopo estrutural, não linear, entre subunidades na região dos aminoácidos 20 e 42, em particular na região de aminoácidos 20 e 30.

A presente invenção também se refere a anticorpos que são capazes de competir com pelo menos um, preferivelmente todos,

os anticorpos seleccionados do grupo que consiste em 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 e 3B10.

O termo "anticorpos competitivos" refere-se aqui a qualquer número de anticorpos que tem como alvo a mesma entidade molecular ou supermolecular ligada estavelmente, mas não covalentemente, preferivelmente a mesma molécula, em que pelo menos uma é capaz de especificamente reduzir a ligação mensurável de outra, preferivelmente impedindo estereoquimicamente o acesso da outra ao seu epítopo alvo ou induzindo e/ou estabilizando uma conformação na entidade alvo que reduz a afinidade do alvo para com o outro anticorpo, mais preferivelmente bloqueando directamente o acesso ao epítopo alvo do outro, através de ligação a um epítopo numa vizinhança suficientemente próxima do primeiro, sobrepondo-se ao primeiro ou idêntico ao primeiro, o mais preferivelmente sobrepondo-se ou idêntico, em particular idêntico. Dois epítopos dizem-se aqui "sobrepostos" se compartilharem parte das suas estruturas químicas, preferivelmente das suas sequências de aminoácidos, e dizem-se "idênticos", se as suas estruturas químicas, preferivelmente as suas sequências de aminoácidos, forem idênticas.

Assim, a presente invenção também se refere a anticorpos cujos epítopos alvo estão sobrepostos a, preferivelmente são idênticos a, o epítopo alvo de pelo menos um dos anticorpos seleccionados do grupo que consiste em 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 e 3B10.

Anticorpos tendo um perfil de ligação similar ao de qualquer um dos ditos anticorpos monoclonais, 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 e 3B10, incluem assim também anticorpos que compreendem pelo menos uma porção da porção de ligação ao antigénio de qualquer um dos ditos anticorpos monoclonais, 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 e 3B10. Preferivelmente, a dita porção compreende pelo menos uma região determinante de complementaridade (CDR) de qualquer um dos ditos anticorpos monoclonais, 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 e 3B10.

Assim, de acordo com uma concretização particular adicional, a presente invenção refere-se a anticorpos

compreendendo a sequência de aminoácidos da CDR3 da cadeia pesada e/ou a sequência de aminoácidos da CDR3 da cadeia leve do anticorpo monoclonal 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 ou 3B10. Exemplos específicos de tais anticorpos incluem aqueles que também compreendem a sequência de aminoácidos da CDR2 da cadeia pesada e/ou a sequência de aminoácidos da CDR2 da cadeia leve do anticorpo monoclonal 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 ou 3B10, respectivamente. Ainda mais especificamente, tais anticorpos incluem aqueles que também compreendem a sequência de aminoácidos da CDR1 da cadeia pesada e/ou a sequência de aminoácidos da CDR1 da cadeia leve do anticorpo monoclonal 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 ou 3B10, respectivamente.

Num aspecto, a presente invenção refere-se assim a anticorpos compreendendo uma cadeia pesada em que o domínio CDR3, CDR2 e/ou CDR1 compreende a sequência de aminoácidos de CDR3, CDR2 e/ou CDR1 da cadeia pesada do anticorpo monoclonal 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 ou 3B10.

Num aspecto adicional, a presente invenção refere-se assim a anticorpos compreendendo uma cadeia leve em que o domínio CDR3, CDR2 e/ou CDR1 compreende a sequência de aminoácidos de CDR3, CDR2 e/ou CDR1 da cadeia leve, respectivamente, do anticorpo monoclonal 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 ou 3B10.

Preferivelmente, o anticorpo compreende pelo menos uma CDR compreendendo uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo que consiste em: resíduos de aminoácido 31-35 de SEQ ID NO:3, resíduos de aminoácido 50-66 de SEQ ID NO:3, resíduos de aminoácido 99-109 de SEQ ID NO:3, resíduos de aminoácido 24-39 de SEQ ID NO:4, resíduos de aminoácido 55-61 de SEQ ID NO:4, resíduos de aminoácido 94-102 de SEQ ID NO:4, resíduos de aminoácido 31-35 de SEQ ID NO:7, resíduos de aminoácido 50-66 de SEQ ID NO:7, resíduos de aminoácido 97-109 de SEQ ID NO:7, resíduos de aminoácido 24-39 de SEQ ID NO:8, resíduos de aminoácido 55-61 de SEQ ID NO:8, resíduos de aminoácido 94-102 de SEQ ID NO:8, resíduos de aminoácido 31-35 de SEQ ID NO:11, resíduos de aminoácido 50-65 de SEQ ID NO:11, resíduos de aminoácido 98-107 de SEQ ID NO:11, resíduos de aminoácido 24-

39 de SEQ ID NO:12, resíduos de aminoácido 55-61 de SEQ ID NO:12, resíduos de aminoácido 94-102 de SEQ ID NO:12, resíduos de aminoácido 31-35 de SEQ ID NO:15, resíduos de aminoácido 50-66 de SEQ ID NO:15, resíduos de aminoácido 99-107 de SEQ ID NO:15, resíduos de aminoácido 24-40 de SEQ ID NO:16, resíduos de aminoácido 56-62 de SEQ ID NO:16, resíduos de aminoácido 95-103 de SEQ ID NO:16, resíduos de aminoácido 31-35 de SEQ ID NO:19, resíduos de aminoácido 50-66 de SEQ ID NO:19, resíduos de aminoácido 99-109 de SEQ ID NO:19, resíduos de aminoácido 24-39 de SEQ ID NO:20, resíduos de aminoácido 55-61 de SEQ ID NO:20, resíduos de aminoácido 94-102 de SEQ ID NO:20, resíduos de aminoácido 31-35 de SEQ ID NO:23, resíduos de aminoácido 50-66 de SEQ ID NO:23, resíduos de aminoácido 99-109 de SEQ ID NO:23, resíduos de aminoácido 24-39 de SEQ ID NO:24, resíduos de aminoácido 55-61 de SEQ ID NO:24, resíduos de aminoácido 94-102 de SEQ ID NO:24, resíduos de aminoácido 31-35 de SEQ ID NO:27, resíduos de aminoácido 50-65 de SEQ ID NO: 27, resíduos de aminoácido 98-101 de SEQ ID NO:27, resíduos de aminoácido 24-39 de SEQ ID NO:28, resíduos de aminoácido 55-61 de SEQ ID NO:28, resíduos de aminoácido 94-102 de SEQ ID NO:28, resíduos de aminoácido 31-35 de SEQ ID NO:31, resíduos de aminoácido 50-66 de SEQ ID NO: 31, resíduos de aminoácido 99-107 de SEQ ID NO:31, resíduos de aminoácido 24-40 de SEQ ID NO:32, resíduos de aminoácido 56-62 de SEQ ID NO:32, resíduos de aminoácido 95-103 de SEQ ID NO:32, resíduos de aminoácido 31-35 de SEQ ID NO:35, resíduos de aminoácido 50-66 de SEQ ID NO:35, resíduos de aminoácido 99-107 de SEQ ID NO:35, resíduos de aminoácido 24-40 de SEQ ID NO:36, resíduos de aminoácido 56-62 de SEQ ID NO:36, resíduos de aminoácido 95-103 de SEQ ID NO:36, resíduos de aminoácido 31-35 de SEQ ID NO:38, resíduos de aminoácido 50-66 de SEQ ID NO:38, e resíduos de aminoácido 98-109 de SEQ ID NO:38.

Numa concretização preferida, o anticorpo compreende pelo menos 3 CDR seleccionadas do grupo que consiste nas sequências divulgadas acima. Mais preferivelmente as 3 CDR seleccionadas são de conjuntos de CDR de domínios variáveis seleccionados do grupo que consiste em:

Conjunto de CDR de VH 5F7	
VH 5F7 CDR-H1	TFYIH: resíduos 31-35 de SEQ ID NO:3
VH 5F7 CDR-H2	MIGPGSGNTYYNEMFKD: resíduos 50-66 de SEQ ID NO:3
VH 5F7 CDR-H3	AKSARAAWFAY: resíduos 99-109 de SEQ ID NO:3
Conjunto de CDR de VL 5F7	
VL 5F7 CDR-L1	RSSQSVVQSNGNTYLE: resíduos 24-39 de SEQ ID NO:4
VL 5F7 CDR-L2	KVSNRFS: resíduos 55-61 de SEQ ID NO:4
VL 5F7 CDR-L3	FQGSHVPPT: resíduos 94-102 de SEQ ID NO:4
Conjunto de CDR de VH 10F11	
VH 10F11 CDR-H1	SYVMH: resíduos 31-35 de SEQ 31-35 of ID'NO:7
VH 10F11 CDR-H2	YIYPYNDGTKYNEKFKG: resíduos 50-66 de SEQ ID NO:7
VH 10F11 CDR-H3	TVEGATWDGYFDV: resíduos 97-109 de SEQ ID NO:7
Conjunto de CDR de VL 10F11	
VL 10F11 CDR-L1	KSSQSLLYSKGKTYLN: resíduos 24-39 de SEQ ID NO:8
VL 10F11 CDR-L2	LVSKLDS: resíduos 55-61 de SEQ ID NO:8
VL 10F11 CDR-L3	VQGTHFPHT: resíduos 94-102 de SEQ ID NO:8
Conjunto de CDR de VH 7C6	
VH 7C6 CDR-H1	SYAMS: resíduos 3.1-35 de SEQ ID NO:11
VH 7C6 CDR-H2	SIHNRGTIFYLDSVKG: resíduos 50-65 de SEQ ID NO:11
VH 7C6 CDR-H3	GRSNSYAMDY: resíduos 98-107 de SEX ID NO:11

Conjunto de CDR de VL 7C6	
VL 7C6 CDR-L1	RSTQTLVHRNGDTYLE: resíduos 24-39 de SEQ ID N0:12
VL 7C6 CDR-L2	KVSNRFS: resíduos 55-61 de SEQ ID NO:12
VL 7C6 CDR-L3	FQGSHVPYT: resíduos 94-102 de SEQ ID NO:12
Conjunto de CDR de VH 4B7	
VH 4B7 CDR-H1	DYEMV: resíduos 31-35 de SEQ ID NO:15
VH 4B7 CDR-H2	YISSGSRTIHYADTVKG: resíduos 50-66 de SEQ ID NO:15
VH 4B7 CDR-H3	TLLRLHFDY: resíduos 99-107 de SEQ ID NO:15
Conjunto de CDR de VL 4B7	
VL 4B7 CDR-L1	RSSQSLFYRSNQKNFLA: resíduos 24-40 de SEQ ID NO:16
VL 4B7 CDR-L2	WASTRES: resíduos 56-62 de SEQ ID NO:16
VL 4B7 CDR-L3	QQYYSYPWT: resíduos 95-103 de SEQ, ID NO:16
Conjunto de CDR de VH 2F2	
VH 2F2 CDR-H1	TFYIH: resíduos 31-35 de SEQ ID NO:19
VH 2F2 CDR-H2,	MIGPGSGNTYYNEMFKD: resíduos 50-66 de SEQ ID NO:19.
VH 2F2 CDR-H3	AKSARAAWFAY: resíduos 99-109 de SEQ ID NO:19
Conjunto de CDR de VL 2F2	
VL 2F2 CDR-L1	RSSQSVVQSNGNTYLE: resíduos 24-39 de SEQ ID NO:20
VL 2F2 CDR-L2	KVSNRFS: resíduos 55-61 de SEQ ID NO:20
VL 2F2 CDR-L3	FQGSHVPPT: resíduos 94-102 de SEQ ID NO:20

Conjunto de CDR de VH 6A2	
VH 6A2 CDR-H1	TFYIH: resíduos 31-35 de SEQ ID NO:23
VH 6A2 CDR-H2	MIGPGSGNTYYNEMFKD: resíduos 50-66 of SEQ ID NO:23
VH 6A2 CDR-H3	AKSHRAAWFAY: resíduos 99-109 de SEQ ID NO:23
Conjunto de CDR de VL 6A2	
VL 6A2 CDR-L1	RSSQSVVQSNGNTYLE: resíduos 24-39 de SEQ ID NO:24
VL 6A2 CDR-L2	KVSNRFF: resíduos 55-61 de SEQ ID NO:24
VL 6A2 CDR-L3	FQGSHVPPT: resíduos 94-102 de SEQ ID NO:24
Conjunto de CDR de VH 4D10	
VH 4D10 CDR-H1	SYGVH: resíduos 31-35 de SEQ ID NO:27
VH 4D10 CDR-H2	VIWRGGRIDYNAAFMS: resíduos 50-65 de SEQ ID NO:27
VH 4D10 CDR-H3	NSDV: resíduos 98-101 de SEQ ID NO:27
Conjunto de CDR de VL 4D10	
VL 4D10 CDR-L1	KSSQSLLDIDGKTYLN: resíduos 24-39 de SEQ ID NO:28
VL 4D10 CDR-L2	LVSKLDS: resíduos 55-61 de SEQ ID NO:28
VL 4D10 CDR-L3	WQGTHFPYT: resíduos 94-102 de SEQ ID NO:28
Conjunto de CDR de VH 7E5	
VH 7E5 CDR-H1	DYEMV: resíduos 31-35 de SEQ ID NO:31
VH 7E5 CDR-H2	YISSGSRTIHYADTVKG: resíduos 50-66 de SEQ ID NO:31
VH 7E5 CDR-H3	TLLRLHFDY: resíduos 99-107 de SEQ ID NO:31

Conjunto de CDR de VL 7E5	
VL 7E5 CDR-L1	RSSQSLFYRSNQKNFLA: resíduos 24-40 de SEQ ID NO:32
VL 7E5 CDR-L2	WASTRES: resíduos 56-62 de SEQ ID NO:32
VL 7E5 CDR-L3	QQYYSYPWT: resíduos 95-103 de SEQ ID NO:32
Conjunto de CDR de VH 10C1	
VH 10C1 CDR-H1	DYEMV: resíduos 31-35 de SEQ ID NO:35
VH 10C1 CDR-H2	YINSGSGTIHYADTVKG: resíduos 50-66 de SEQ ID NO:35
VH 10C1 CDR-H3	TLLRLHFDY: resíduos 99-107 de SEQ ID NO:35
Conjunto de CDR de VL 10C1	
VL 10C1 CDR-L1	KSSQSLFYSRNQKNFLA: resíduos 24-40 de SEQ ID NO:36
VL 10C1 CDR-L2	WASTGES: resíduos 56-62 de SEQ ID NO:36
VL 10C1 CDR-L3	QQYFSYPWT: resíduos 95-103 de SEQ ID NO:36
Conjunto de CDR de VH 3B10	
VH 3B10 CDR-H1	DYVIH: resíduos 31-35 de SEQ ID NO:38
VH 3B10 CDR-H2	YINPYNDGTQYNEKFKG: resíduos 50-66 de SEQ ID NO:38
VH 3B10 CDR-H3	VEGGTWDGYFDV: resíduos 98-109 de SEQ ID NO:38

Numa concretização, o anticorpo da invenção compreende pelo menos dois conjuntos de CDR de domínios variáveis. Mais preferivelmente, os dois conjuntos de CDR de domínios variáveis são seleccionados do grupo que consiste em: Conjunto de CDR de VH 5F7 & Conjunto de CDR de VL 5F7; Conjunto de CDR de VH 10F11 & Conjunto de CDR de VL 10F11; Conjunto de CDR de VH 7C6 & Conjunto de CDR de VL 7C6; Conjunto de CDR de VH 4B7 & Conjunto de CDR de VL 4B7; Conjunto de CDR de VH 2F2 & Conjunto de CDR de VL 2F2;

Conjunto de CDR de VH 6A2 & Conjunto de CDR de VL 6A2; Conjunto de CDR de VH 4D10 & Conjunto de CDR de VL 4D10; Conjunto de CDR de VH 7E5 & Conjunto de CDR de VL 7E5; e Conjunto de CDR de VH 10C1 & Conjunto de CDR de VL 10C1.

Numa outra concretização o anticorpo divulgado acima compreende adicionalmente uma estrutura aceitadora humana.

Numa concretização preferida o anticorpo é um anticorpo enxertado com CDR. Preferivelmente o anticorpo enxertado com CDR compreende uma ou mais das CDR divulgadas acima.

Preferivelmente o anticorpo enxertado com CDR compreende uma estrutura aceitadora humana.

Numa concretização preferida o anticorpo é um anticorpo humanizado. Preferivelmente o anticorpo humanizado compreende uma ou mais das CDR divulgadas acima. Mais preferivelmente o anticorpo humanizado compreende três ou mais das CDR divulgadas acima. O mais preferivelmente o anticorpo humanizado compreende seis CDR divulgadas acima. Numa concretização particular, as CDR são incorporadas num domínio variável de anticorpo humano de uma estrutura aceitadora humana. Preferivelmente o domínio variável de anticorpo humano é um domínio variável humano de consenso. Mais preferivelmente a estrutura aceitadora humana compreende pelo menos uma substituição de aminoácido na Região de Estrutura ("*Framework Region*"), num resíduo chave, em que o resíduo chave é seleccionado do grupo que consiste num resíduo adjacente a uma CDR; um resíduo de local de glicosilação; um resíduo raro; um resíduo capaz de interagir com o globulómero A (20-42); um resíduo capaz de interagir com uma CDR; um resíduo canónico; um resíduo de contacto entre a região variável da cadeia pesada e a região variável da cadeia leve; um resíduo numa zona de Vernier; e um resíduo numa região que se sobrepõe entre uma CDR1 da cadeia pesada variável definida por Chothia e uma primeira estrutura da cadeia pesada definida por Kabat. Preferivelmente a estrutura aceitadora humana compreende pelo menos uma substituição de aminoácido na Região de Estrutura, em que a sequência de aminoácidos da estrutura é pelo menos 65% idêntica à sequência da dita estrutura aceitadora humana e compreende pelo menos 70 resíduos de aminoácido idênticos à dita estrutura aceitadora humana.

Ainda num aspecto adicional, a presente invenção refere-se a anticorpos compreendendo tanto a cadeia pesada como a cadeia leve como definido acima.

Preferivelmente, o anticorpo compreende pelo menos um domínio variável tendo uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo que consiste em: SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, e SEQ ID NO:38. Mais preferivelmente, o anticorpo compreende dois domínios variáveis, em que os ditos dois domínios variáveis têm sequências de aminoácidos seleccionadas do grupo que consiste em: SEQ ID NO:3 & SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7 & SEQ ID NO:8 & SEQ ID NO:11 & SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:15 & SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:19 & SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:23 & SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:27 & SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:31 & SEQ ID NO:32, e SEQ ID NO:35 & SEQ ID NO:36.

Num outro aspecto, os anticorpos da presente invenção compreendem uma região constante da cadeia pesada seleccionada do grupo que consiste em regiões constantes de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD, IgE e regiões constantes mutantes Ala234 Ala235 de IgG1 humana. Em particular, os anticorpos compreendem uma região constante humana. Mais preferivelmente, os anticorpos compreendem uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 39-42. Os anticorpos compreendendo uma região constante da cadeia pesada de IgG1 são preferidos.

Numa outra concretização o anticorpo é glicosilado. Preferivelmente o padrão de glicosilação é um padrão de glicosilação humano ou um padrão de glicosilação produzido por qualquer uma das células eucariotas aqui divulgadas, em particular células CHO.

A presente invenção também se refere a uma porção de ligação ao antigénio de um anticorpo da presente invenção. Estas porções de ligação ao antigénio incluem, mas sem limitações, fragmentos Fab, fragmentos $F(ab')_2$ e fragmentos Fv de cadeia única, do anticorpo. Porções de ligação ao antigénio adicionais são fragmentos Fab', fragmentos Fv, e fragmentos Fv ligados por dissulfureto.

A invenção também proporciona um ácido nucleico isolado que codifica qualquer um dos anticorpos aqui divulgados. Uma concretização adicional proporciona um vector compreendendo o ácido nucleico isolado aqui divulgado. O dito vector pode em particular ser seleccionado do grupo que consiste em pcDNA; pTT (Durocher *et al.*, *Nucleic Acids Research* 2002, Vol 30, No.2); pTT3 (pTT com locais de clonagem múltiplos adicionais; pEFBOS (Mizushima, S. e Nagata, *S.*, (1990) *Nucleic Acids Research* Vol 18, No. 17); pBV; pJV; e pBJ.

Num outro aspecto uma célula hospedeira é transformada com o vector aqui divulgado. Preferivelmente a célula hospedeira é uma célula procariota. Mais preferivelmente a célula hospedeira é *E.coli*. Numa concretização relacionada a célula hospedeira é uma célula eucariota. Preferivelmente a célula eucariota é seleccionada do grupo que consiste numa célula protista, uma célula animal (por exemplo, uma célula de mamífero, uma célula de aves, e uma célula de insecto), uma célula de planta e uma célula fúngica. Mais preferivelmente a célula hospedeira é uma célula de mamífero incluindo, mas sem limitações, CHO e COS; ou uma célula fúngica, por exemplo, uma célula de levedura, tal como *Saccharomyces cerevisiae*; ou uma célula de insecto tal como Sf9.

Um outro aspecto da invenção proporciona um método de produção de um anticorpo da invenção, compreendendo a cultura de qualquer uma das células hospedeiras ou de um hibridoma aqui divulgados, num meio de cultura em condições adequadas para produzir o anticorpo. Uma outra concretização proporciona um anticorpo que é obtenível pelo método aqui divulgado.

Os anticorpos da presente invenção podem ser obtidos de uma maneira conhecida *per se*.

Linfócitos B que, na totalidade, contêm um repertório de anticorpos composto por centenas de bilhões de especificidades de anticorpos diferentes constituem uma parte do sistema imunitário do mamífero. Uma resposta imunitária normal a um antigénio particular significa a selecção de um ou mais anticorpos do dito repertório que se ligam especificamente ao dito antigénio, e o sucesso de uma resposta imunitária é baseado, pelo menos parcialmente, na capacidade dos ditos anticorpos reconhecerem especificamente

(e ultimamente eliminarem) o antigénio estimulante e ignorarem outras moléculas no ambiente dos ditos anticorpos.

A utilidade de anticorpos que reconhecem especificamente um antigénio alvo particular levou ao desenvolvimento da tecnologia dos anticorpos monoclonais. A tecnologia dos hibridomas padronizada permite agora a produção de anticorpos com uma única especificidade para um antigénio de interesse. Mais recentemente, foram desenvolvidas técnicas de anticorpos recombinantes tais como o rastreio *in vitro* de bibliotecas de anticorpos. Estas técnicas permitem da mesma forma produzir anticorpos tendo uma única especificidade para um antigénio de interesse.

No método da invenção, o antigénio de interesse pode ser deixado actuar sobre o repertório de anticorpos tanto *in vivo* como *in vitro*.

De acordo com uma concretização, deixa-se o antigénio actuar sobre o repertório imunizando um animal *in vivo* com o dito antigénio. Esta abordagem *in vivo* pode, além disso, compreender o estabelecimento, a partir dos linfócitos de um animal, de um número de hibridomas, e a selecção de um hibridoma particular que segrega um anticorpo que se liga especificamente ao dito antigénio. O animal a imunizar pode ser, por exemplo, um ratinho, um rato, um coelho, uma galinha, camelídeos ou carneiros, ou pode ser uma versão transgénica de qualquer dos animais mencionados acima, por exemplo, um ratinho transgénico com genes de imunoglobulina humana, que produz anticorpos humanos após um estímulo antigénico. Outros tipos de animais que podem ser imunizados incluem ratinhos com imunodeficiência combinada grave (SCID) que foram reconstituídos com células mononucleares de sangue periférico humanas (ratinhos hu-PBMC SCID quiméricos) ou com células linfóides ou seus precursores, bem como ratinhos que foram tratados com uma irradiação letal de corpo inteiro, e em seguida protegidos contra a radiação com células da medula óssea de um ratinho com imunodeficiência combinada grave (SCID) e subsequentemente transplantados com linfócitos humanos funcionais (o sistema "Trimera"). Um outro tipo de animal a imunizar é um animal (por exemplo, um ratinho) em cujo genoma um gene endógeno que codifica o antigénio de interesse foi "desligado"

(silenciado), por exemplo, por recombinação homóloga, de maneira a que, após imunização com o antigénio, o dito animal reconheça o dito antigénio como estranho. É óbvio para os técnicos especializados que os anticorpos policlonais ou monoclonais produzidos por este método são caracterizados e seleccionados usando métodos de rastreio conhecidos que incluem, mas sem limitações, técnicas de ELISA e *dot blot*.

De acordo com uma outra concretização, deixa-se actuar o antigénio sobre o repertório de anticorpos *in vitro* por rastreio de uma biblioteca de anticorpos recombinantes com o dito antigénio. A biblioteca de anticorpos recombinantes pode ser expressa, por exemplo, na superfície de bacteriófagos ou na superfície de células de levedura ou na superfície de células bacterianas. Numa variedade de concretizações, a biblioteca de anticorpos recombinantes é uma biblioteca de scFv ou uma biblioteca de Fab, por exemplo. De acordo com uma outra concretização, as bibliotecas de anticorpos são expressas como fusões ARN-proteína.

Uma outra abordagem para produzir anticorpos da invenção compreende uma combinação de abordagens *in vivo* e *in vitro*. Por exemplo, pode-se deixar actuar o antigénio sobre o repertório de anticorpos imunizando um animal *in vivo* com o dito antigénio e em seguida rastreando *in vitro* com o dito antigénio uma biblioteca de anticorpos recombinantes preparada a partir de células linfóides do dito animal ou uma biblioteca de anticorpos de domínio único (por exemplo, contendo cadeias pesadas e/ou leves). De acordo com uma outra abordagem, deixa-se actuar o antigénio sobre o repertório de anticorpos imunizando um animal *in vivo* com o dito antigénio e em seguida submetendo uma biblioteca de anticorpos recombinantes ou uma biblioteca de domínios únicos produzida a partir de células linfóides do dito animal para maturação por afinidade. De acordo com uma outra abordagem, deixa-se actuar o antigénio sobre o repertório de anticorpos imunizando um animal *in vivo* com o dito antigénio, em seguida seleccionando células produtoras de anticorpo individuais que segregam um anticorpo de interesse, e obtendo, a partir das ditas células seleccionadas, ADNc para a região variável das cadeias pesada e leve (por exemplo, por meio de PCR) e expressando as ditas regiões variáveis das cadeias pesada e leve em

células hospedeiras de mamífero *in vitro* (isto sendo referido como método de anticorpo de linfócito seleccionado ou SLAM), sendo assim possível seleccionar e manipular adicionalmente as sequências génicas do anticorpo seleccionado. Além disso, anticorpos monoclonais podem ser seleccionados por clonagem de expressão, expressando os genes do anticorpo para as cadeias pesada e leve em células de mamífero e seleccionando as células de mamífero que segregam um anticorpo tendo a afinidade de ligação desejada.

A presente invenção proporciona antigénios definidos para rastreio e contra-rastreio. Assim é possível, de acordo com a invenção, seleccionar os anticorpos policlonais e monoclonais que se ligam a um globulómero A (20-42) com as afinidades de ligação como definido acima.

Os métodos da invenção para produzir anticorpos podem ser usados para produzir vários tipos de anticorpos. Estes incluem anticorpos monoclonais, em particular anticorpos recombinantes, especialmente anticorpos essencialmente humanos, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados e anticorpos enxertados com CDR, e também suas porções de ligação ao antigénio.

A presente invenção refere-se adicionalmente a um hibridoma que é capaz de produzir (segregar) um anticorpo monoclonal da presente invenção. Os hibridomas da presente invenção incluem os designados pelos números de depósito na American Type Culture Collection seleccionados do grupo que consiste em PTA-7241, PTA-7239, PTA-7240, PTA-7242, PTA-7408, PTA-7409, PTA-7405, PTA-7809, PTA-7810 e PTA-7851.

Note-se que os anticorpos da presente invenção podem também ser reactivos com, isto é, ligar-se a, outras formas de A que não os globulómeros A aqui descritos. Estes antigénios podem, ou não, ser oligoméricos ou globuloméricos. Assim, os antigénios aos quais os anticorpos da presente invenção se ligam, incluem qualquer forma de A que compreenda o epítopo do globulómero com o qual os anticorpos da presente invenção são reactivos. Tais formas de A incluem formas A (X-Y) truncadas e não truncadas (com X e Y definidos como acima), tais como as formas A (20-42), A (20-40), A (12-42), A (12-40), A e (1-42)

A (1-40), desde que as ditas formas compreendam o epítopo do globulómero.

A presente invenção também se refere a uma composição compreendendo um anticorpo da invenção ou uma sua porção de ligação ao antigénio, como definido acima.

De acordo com uma concretização particular, a dita composição é uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo da invenção ou a porção de ligação ao antigénio e um transportador farmacêutico aceitável.

O anticorpo da invenção ou a porção de ligação ao antigénio como definido acima são preferivelmente capazes de neutralizar, tanto *in vitro* como *in vivo*, a actividade do globulómero A ou de um seu derivado aos quais se ligam. O dito anticorpo ou porção de ligação ao antigénio podem portanto ser usados para inibir a actividade do dito globulómero ou do seu derivado, por exemplo, numa preparação contendo o dito globulómero ou seu derivado ou em indivíduos humanos ou outros mamíferos nos quais o dito globulómero ou seu derivado está presente.

De acordo com uma concretização, a invenção refere-se a um método para inibir a actividade do dito globulómero ou do seu derivado, método esse que compreende deixar actuar um anticorpo da invenção, ou uma sua porção de ligação ao antigénio, sobre um globulómero ou um seu derivado, de maneira a inibir a actividade do dito globulómero ou do seu derivado. A dita actividade pode ser inibida *in vitro*, por exemplo. Por exemplo, o anticorpo da invenção ou a porção de ligação ao antigénio podem ser adicionados a uma preparação tal como uma amostra derivada de um sujeito ou uma cultura de células que contêm ou se suspeita que contenham o dito globulómero ou o seu derivado, a fim de inibir a actividade do dito globulómero ou do seu derivado na dita amostra. Alternativamente, a actividade do globulómero ou seu derivado pode ser inibida num indivíduo *in vivo*.

Assim a presente invenção refere-se adicionalmente ao uso de um anticorpo ou uma porção de ligação ao antigénio como definido acima para preparar uma composição farmacêutica para tratar ou prevenir uma amiloidose, em particular uma amiloidose seleccionada do grupo que consiste

em doença de Alzheimer e a amiloidose da síndrome de Down. Um aspecto do dito uso da invenção é portanto um método para tratar ou prevenir uma amiloidose, em particular doença de Alzheimer ou a amiloidose da síndrome de Down, num sujeito disso necessitado, que compreende administrar um anticorpo ou uma porção de ligação ao antigénio como definido acima ao sujeito. O uso do dito anticorpo ou porção de ligação ao antigénio para tratar e especialmente prevenir a amiloidose, em particular doença de Alzheimer ou a amiloidose da síndrome de Down, é em particular para imunização passiva. Consequentemente, no método de tratamento ou prevenção de uma amiloidose, em particular doença de Alzheimer ou a amiloidose da síndrome de Down, num sujeito disso necessitado, um propósito da administração do anticorpo ou da porção de ligação ao antigénio ao sujeito é imunizar passivamente o sujeito contra a amiloidose, em particular a doença de Alzheimer ou a amiloidose da síndrome de Down.

O anticorpo da invenção ou a porção de ligação ao antigénio como definido acima são preferivelmente capazes de detectar, tanto *in vitro* como *in vivo*, um globulómero A ou um seu derivado ao qual se ligam. O dito anticorpo ou a porção de ligação ao antigénio podem portanto ser usados para detectar o dito globulómero ou o seu derivado, por exemplo, numa preparação contendo o dito globulómero ou o seu derivado ou em indivíduos humanos ou outros mamíferos nos quais o dito globulómero ou seus derivados estão presentes.

De acordo com uma concretização, a invenção refere-se a um método para detectar o dito globulómero ou o seu derivado, método esse que compreende deixar actuar um anticorpo da invenção ou uma sua porção de ligação ao antigénio sobre um globulómero ou um seu derivado, de maneira a ligar-se ao dito globulómero ou seu derivado (e dessa maneira preferivelmente formar um complexo compreendendo o anticorpo ou uma sua porção de ligação ao antigénio e o globulómero ou seu derivado). O dito globulómero pode ser detectado *in vitro*, por exemplo. Por exemplo, o anticorpo da invenção ou a porção de ligação ao antigénio podem ser adicionados a uma preparação, por exemplo, uma amostra derivada de um sujeito ou uma cultura de células que contêm ou se suspeita que contenham o dito

globulómero ou seu derivado, a fim de detectar o dito globulómero ou o seu derivado na dita preparação. Alternativamente, o globulómero ou o seu derivado podem ser detectados num indivíduo *in vivo*.

Assim a presente invenção refere-se adicionalmente ao uso de um anticorpo ou uma porção de ligação ao antigénio como definido acima para preparar uma composição para diagnosticar uma amiloidose, em particular doença de Alzheimer ou a amiloidose da síndrome de Down. Um aspecto do dito uso da invenção é um método de diagnóstico de uma amiloidose, em particular doença de Alzheimer ou a amiloidose da síndrome de Down, num sujeito suspeito de ter a amiloidose, em particular doença de Alzheimer ou a amiloidose da síndrome de Down, que compreende administrar ao sujeito um anticorpo ou uma porção de ligação ao antigénio como definido acima e detectar a formação de um complexo compreendendo o anticorpo ou a porção de ligação ao antigénio com o antigénio, em que a presença do complexo indica a amiloidose, em particular doença de Alzheimer ou a amiloidose da síndrome de Down, no sujeito. Um segundo aspecto do dito uso da invenção é um método de diagnóstico de uma amiloidose, em particular doença de Alzheimer ou a amiloidose da síndrome de Down, num sujeito suspeito de ter a amiloidose, em particular doença de Alzheimer ou a amiloidose da síndrome de Down, que compreende proporcionar uma amostra do sujeito, colocar em contacto a amostra com um anticorpo ou uma porção de ligação ao antigénio como definido acima e detectar a formação de um complexo compreendendo o anticorpo ou a porção de ligação ao antigénio com o antigénio, em que a presença do complexo indica a amiloidose, em particular doença de Alzheimer ou a amiloidose da síndrome de Down, no sujeito.

Descrição detalhada da invenção

As afinidades de ligação dos anticorpos da invenção podem ser avaliadas usando imunoensaios *in vitro* padronizados tais como as análises ELISA, *dot blot* ou BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suécia e Piscataway, NJ). Para descrições adicionais, ver Jönsson, U., *et al.* (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jönsson, U., *et al.* (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Jöhnsson, B., *et*

al. (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; e Jöhnsson, B., *et al.* (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.

De acordo com uma concretização particular, as afinidades definidas aqui referem-se aos valores obtidos realizando um *dot blot* da maneira descrita no exemplo 8 e avaliando-o por densitometria. De acordo com uma concretização particular da invenção, determinar a afinidade de ligação por *dot blot* compreende o seguinte: uma certa quantidade do antigénio (por exemplo, o globulómero A (X-Y), monómero AX-Y) ou fibrilhas de A (X-Y), como definido acima) ou, convenientemente, uma sua diluição apropriada, por exemplo, em NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, BSA a 0,2 mg/mL para uma concentração de antigénio de, por exemplo, 100 pmol/µL, 10 pmol/µL, 1 pmol/µL, 0,1 pmol/µL e 0,01 pmol/µL, é aplicada numa membrana de nitrocelulose, a membrana é em seguida bloqueada com leite para impedir ligação não específica e lavada, em seguida é colocada em contacto com o anticorpo de interesse seguindo-se a detecção deste último por meio de um anticorpo secundário conjugado com uma enzima e uma reacção colorimétrica; para concentrações de anticorpo definidas, a quantidade do anticorpo ligado permite a determinação da afinidade. Assim a afinidade relativa de dois diferentes anticorpos para com um alvo, ou de um anticorpo para com dois alvos diferentes, é aqui definida como a relação das quantidades respectivas de anticorpo ligado ao alvo observado com as duas combinações alvo-anticorpo sob condições de *dot blot* em tudo o resto idênticas. Ao contrário de uma abordagem similar baseada em *Western blotting*, a abordagem *dot blot* determinará uma afinidade do anticorpo para com um dado alvo na conformação natural deste último; ao contrário da abordagem ELISA, a abordagem *dot blot* não sofre das diferenças nas afinidades entre diferentes alvos e a matriz, permitindo dessa maneira comparações mais precisas entre diferentes alvos.

O termo "K_d", da maneira aqui usada, destina-se a referir a constante de dissociação de uma interacção anticorpo-antigénio particular como é conhecido na técnica.

Os anticorpos da presente invenção são preferivelmente anticorpos isolados. Um "anticorpo isolado" significa um

anticorpo tendo as afinidades de ligação como descrito acima e que está essencialmente isento de outros anticorpos tendo afinidades de ligação diferentes. O termo "essencialmente isento" refere-se aqui a uma preparação do anticorpo em que pelo menos 95% dos anticorpos, preferivelmente pelo menos 98% dos anticorpos e mais preferivelmente pelo menos 99% dos anticorpos têm a afinidade de ligação desejada. Além disso, um anticorpo isolado pode ser substancialmente isento de outros materiais celulares e/ou substâncias químicas.

Os anticorpos isolados da presente invenção incluem anticorpos monoclonais. Um "anticorpo monoclonal" da maneira aqui usada, destina-se a referir uma preparação de moléculas do anticorpo, anticorpos que compartilham uma sequência de aminoácidos de cadeia pesada comum e cadeia leve comum, ao contrário de preparações de anticorpo "policlonal" que contém uma mistura de anticorpos com diferentes sequências de aminoácidos. Os anticorpos monoclonais podem ser gerados por diversas novas tecnologias como exibição em fagos, bactérias, leveduras ou ribossómica, bem como por métodos clássicos exemplificados por anticorpos derivados de hibridomas (por exemplo, um anticorpo segregado por um hibridoma preparado por tecnologia de hibridomas, tal como a metodologia de hibridoma padrão de Kohler e Milstein ((1975) *Nature* 256:495-497). Assim, um anticorpo não derivado de hibridomas com sequência uniforme é ainda referido aqui como um anticorpo monoclonal embora possa ter sido obtido por metodologias não clássicas, e o termo "monoclonal" não está restringido a anticorpos derivados de hibridomas, mas é usado para referir todos os anticorpos derivados de um clone de ácido nucleico.

Assim, os anticorpos monoclonais da presente invenção incluem anticorpos recombinantes. O termo "recombinante" refere-se aqui a qualquer combinação artificial de dois segmentos de sequência de outra forma separados, por exemplo, por síntese química ou pela manipulação de segmentos isolados de ácidos nucleicos por técnicas de engenharia genética. Em particular, o termo "anticorpo recombinante" refere-se aos anticorpos que são produzidos, expressos, gerados ou isolados por meios recombinantes, tais como anticorpos que são expressos usando um vector de expressão recombinante transfectado numa célula hospedeira; anticorpos isolados de

uma biblioteca combinatória de anticorpos recombinantes; anticorpos isolados a partir de um animal (por exemplo, um ratinho) que é transgénico devido a genes de imunoglobulina humana (ver, por exemplo, Taylor, L.D., *et al.* (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295); ou anticorpos que são produzidos, expressos, gerados ou isolados de qualquer outra maneira em que sequências de genes de imunoglobulina particulares (tais como sequências de genes de imunoglobulina humana) são montadas com outras sequências de ADN. Os anticorpos recombinantes incluem, por exemplo, anticorpos quiméricos, enxertados com CDR e humanizados. O perito na especialidade saberá que a expressão de um anticorpo monoclonal derivado de hibridoma convencional num sistema heterólogo exigirá a geração de um anticorpo recombinante mesmo se a sequência de aminoácidos da proteína do anticorpo resultante não for alterada ou se pretenda alterada.

Numa concretização particular da invenção, o anticorpo é um anticorpo humanizado.

De acordo com uma multiplicidade de concretizações, o anticorpo pode compreender uma sequência de aminoácidos derivada inteiramente de uma única espécie, tal como um anticorpo humano ou um anticorpo de ratinho. De acordo com outras concretizações, o anticorpo pode ser um anticorpo quimérico ou um anticorpo enxertado com CDR ou outra forma de um anticorpo humanizado.

O termo "anticorpo" destina-se a referir moléculas de imunoglobulina consistindo em 4 cadeias polipeptídicas, duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L). As cadeias estão geralmente ligadas umas às outras por meio de ligações de dissulfureto. Cada cadeia pesada é composta por uma região variável da dita cadeia pesada (abreviada aqui como HCVR ou VH) e uma região constante da dita cadeia pesada. A região constante da cadeia pesada consiste em três domínios CH1, CH2 e CH3. Cada cadeia leve é composta por uma região variável da dita cadeia leve (abreviada aqui como LCVR ou VL) e uma região constante da dita cadeia leve. A região constante da cadeia leve consiste num domínio CL. As regiões VH e VL podem ser adicionalmente divididas em regiões hipervariáveis referidas como regiões determinantes de complementaridade (CDR) e intercaladas com regiões

conservadas referidas como regiões de estrutura (FR). Cada região VH e VL consiste assim em três CDR e quatro FR que estão dispostas, do terminal N para o terminal C, pela seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Esta estrutura é bem conhecida dos peritos na especialidade.

O termo "porção de ligação ao antigénio" de um anticorpo (ou simplesmente "porção de anticorpo") refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo da invenção, o(s) dito(s) fragmento(s) tendo ainda as afinidades de ligação como definido acima. Mostrou-se que os fragmentos de um anticorpo completo são capazes de realizar a função de ligação ao antigénio de um anticorpo. De acordo com o termo "porção de ligação ao antigénio" de um anticorpo, os exemplos de fragmentos de ligação incluem (i) um fragmento Fab, isto é, um fragmento monovalente composto pelos domínios VL, VH, CL e CH1; (ii) um fragmento $F(ab')_2$, isto é, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados um ao outro na região de charneira por uma ponte de dissulfureto; (iii) um fragmento Fd composto pelos domínios VH e CH1; (iv) um fragmento Fv composto pelos domínios FL e VH de um único braço de um anticorpo; (v) um fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546) consistindo num domínio VH ou em VH, CH1, CH2, DH3, ou VH, CH_2, CH3; e (vi) uma região determinante de complementaridade (CDR) isolada. Embora os dois domínios do fragmento Fv, nomeadamente VL e VH, sejam codificados por genes separados, podem adicionalmente ser ligados um ao outro usando um ligante sintético, por exemplo, uma sequência de aminoácidos poli-G_4S, e métodos recombinantes, tornado possível prepará-los na forma de uma cadeia de proteína única em que as regiões VL e VH se combinam de modo a formar moléculas monovalentes (conhecidas como Fv de cadeia única (ScFv); ver, por exemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; e Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 85:5879-5883). O termo "porção de ligação ao antigénio" de um anticorpo destina-se também a compreender estes anticorpos de cadeia única. Outras formas de anticorpos de cadeia única tais como "diacorpos" estão da mesma forma aqui incluídos. Os diacorpos são anticorpos bivalentes biespecíficos, em que os domínios VH e VL são expressos numa única cadeia polipeptídica, mas usando um ligante que é demasiado curto para que os dois domínios sejam capazes de se combinar na mesma cadeia, forçando dessa maneira

os ditos domínios a emparelhar com domínios complementares de uma cadeia diferente e a formar dois locais de ligação ao antigénio (ver, por exemplo, Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 90:6444-6448; Poljak, R.J., *et al.* (1994) *Structure* 2:1121-1123). Um domínio constante de imunoglobulina refere-se a um domínio constante da cadeia pesada ou leve. As sequências de aminoácidos do domínio constante da cadeia pesada e da cadeia leve da IgG humana são conhecidas na técnica e estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1: Sequência do domínio constante da cadeia pesada e do domínio constante da cadeia leve de IgG humana.

Proteína	ID da Sequência	Sequência
		123456789012345678901234567890123
região constante gama-1 de Ig	SEQ ID NO:39	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
região constante gama-1 de Ig mutante	SEQ ID NO:40	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
região constante capa de Ig	SEQ ID NO:41	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
região constante lambda de Ig	SEQ ID NO:42	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNK YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS

Além disso, um anticorpo da presente invenção ou uma sua porção de ligação ao antigénio podem ser parte de uma molécula

de imunoadesão maior formada por associação covalente ou não covalente do dito anticorpo ou porção de anticorpo com uma ou mais outras proteínas ou péptidos. São relevantes para estas moléculas de imunoadesão o uso da região nuclear de estreptavidina a fim de preparar uma molécula de scFv tetramérica (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) e o uso de um resíduo de cisteína, um péptido marcador e um sinalizador de poli-histidinilo C-terminal, por exemplo, hexa-histidinilo, a fim de produzir moléculas de scFv bivalentes e biotiniladas (Kipriyanov, S.M., *et al.* (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058).

O termo "anticorpo humano" refere-se a anticorpos cujas regiões variáveis e constantes correspondem a, ou são derivadas de, sequências de imunoglobulina da linha germinal humana, da maneira descrita, por exemplo, por Kabat *et al.* (ver Kabat, *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition,* U.S. Department *de* Health *and* Human *Services,* NIH Publicação No. 91-3242). Contudo, os anticorpos humanos da invenção podem conter resíduos de aminoácido não codificados por sequências de imunoglobulina da linha germinal humana (por exemplo, mutações que foram introduzidas por mutagénese aleatória ou específica do local *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*), por exemplo, nas CDR, e em particular na CDR3. Os anticorpos humanos recombinantes da invenção têm regiões variáveis e podem também conter regiões constantes derivadas de sequências de imunoglobulina da linha germinal humana (ver Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition,* U.S. Department de Health and Human Services, NIH Publicação No. 91-3242): De acordo com concretizações particulares, contudo, tais anticorpos humanos recombinantes são submetidos a mutagénese *in vitro* (ou a mutagénese somática *in vivo*, se for usado um animal que é transgénico devido a sequências de Ig humana) de maneira que as sequências de aminoácidos das regiões VH e VL dos anticorpos recombinantes são sequências que embora relacionadas ou derivadas de sequências VH e VL da linha germinal humana, não existem naturalmente *in vivo* no repertório de anticorpos da linha germinal humana. De acordo com concretizações particulares, anticorpos recombinantes deste tipo são o resultado de mutagénese

selectiva ou retromutação ou de ambas. Preferivelmente, a mutagénese leva a uma afinidade para com o alvo que é maior, e/ou a uma afinidade para com estruturas não alvo que é menor, do que as do anticorpo parental.

O termo "anticorpo quimérico" refere-se a anticorpos que contêm sequências para a região variável das cadeias pesada e leve de uma espécie e sequências da região constante de uma outra espécie, tais como anticorpos tendo regiões variáveis de cadeia pesada e leve murinas ligadas a regiões constantes humanas.

O termo "anticorpo enxertado com CDR" refere-se aos anticorpos que compreendem sequências da região variável de cadeia pesada e leve de uma espécie, mas em que as sequências de uma ou mais das regiões CDR de VH e/ou VL estão substituídas por sequências de CDR de uma outra espécie, tais como anticorpos tendo regiões variáveis de cadeia pesada e leve murinas em que uma ou mais das CDR murinas (por exemplo, CDR3) foi substituída por sequências de CDR humanas.

O termo "anticorpo humanizado" refere-se a anticorpos que contêm sequências da região variável de cadeias pesadas e leves de uma espécie não humana (por exemplo, ratinho, rato, coelho, galinha, camelídeo, carneiro ou cabra), mas em que pelo menos uma parte da sequência de VH e/ou VL foi alterada a fim de ser mais "similar a humana", isto é, a ser mais similar às sequências variáveis da linha germinal humana. Um tipo de um anticorpo humanizado é um anticorpo enxertado com CDR em que sequências de CDR humanas foram inseridas em sequências de VH e VL não humanas para substituir as sequências de CDR não humanas correspondentes.

Os termos "numeração de Kabat", "definições de Kabat" e "marcação de Kabat" são usados aqui indiferentemente. Estes termos, que são reconhecidos na técnica, referem-se a um sistema de numeração de resíduos de aminoácido que são mais variáveis (isto é, hipervariáveis) que outros resíduos de aminoácido nas regiões variáveis de cadeia pesada e leve de um anticorpo, ou uma sua porção de ligação ao antigénio (Kabat *et al.* (1971) *Ann. NY Acad, Sci.* 190:382-391 e Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological*

Interest, Fifth Edition, U.S. Department de Health and Human Services, NIH Publicação No. 91-3242). Para a região variável da cadeia pesada, a região hipervariável estende-se nas posições de aminoácido 31 a 35 para CDR1, nas posições de aminoácido 50 a 65 para CDR2 e nas posições de aminoácido 95 a 102 para CDR3. Para a região variável de cadeia leve, a região hipervariável estende-se nas posições de aminoácido 24 a 34 para CDR1, nas posições de aminoácido 50 a 56 para CDR2 e nas posições de aminoácido 89 a 97 para CDR3.

Da maneira aqui usada, os termos "aceitador" e "anticorpo aceitador" referem-se ao anticorpo ou sequência de ácido nucleico que proporciona ou codifica pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou 100% das sequências de aminoácidos de uma ou mais das regiões de estrutura. Em algumas concretizações, o termo "aceitador" refere-se à sequência de aminoácidos ou de ácido nucleico do anticorpo que proporciona ou codifica a(s) região(ões) constante(s). Ainda numa outra concretização, o termo "aceitador" refere-se à sequência de aminoácidos ou de ácido nucleico do anticorpo que proporciona ou codifica uma ou mais das regiões de estrutura e da(s) região(ões) constante(s). Numa concretização específica, o termo "aceitador" refere-se a um sequência de aminoácido ou de ácido nucleico do anticorpo humano que proporciona ou codifica pelo menos 80%, preferivelmente, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, ou 100% da sequência de aminoácidos de uma ou mais das regiões de estrutura. De acordo com esta concretização, um aceitador pode conter pelo menos 1, pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, ou pelo menos 10 resíduos de aminoácido que não ocorrem numa ou mais posições específicas de um anticorpo humano. Uma região de estrutura do aceitador e/ou região(ões) constante(s) do aceitador podem ser, por exemplo, derivadas ou obtidas de um gene de anticorpo da linha germinal, um gene de anticorpo maduro, um anticorpo funcional (por exemplo, anticorpos bem conhecidos na técnica, anticorpos em desenvolvimento, ou anticorpos comercialmente disponíveis).

Da maneira aqui usada, o termo "CDR" refere-se à região determinante de complementaridade nas sequências variáveis dos anticorpos. Existem três CDR em cada uma das regiões

variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve, que são designadas CDR1, CDR2 e CDR3, para cada uma das regiões variáveis. O termo "conjunto de CDR" da maneira aqui usada aqui refere-se a um grupo de três CDR que ocorrem numa única região variável capaz de ligar o antigénio. Os limites exactos destas CDR foram definidos de forma diferente de acordo com sistemas diferentes. O sistema descrito por Kabat (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) e (1991)) não apenas proporciona um sistema de numeração de resíduos não ambíguo aplicável a qualquer região variável de um anticorpo, como também proporciona limites de resíduos precisos que definem as três CDR. Estas CDR podem ser referidas como as CDR de Kabat. Chothia e colaboradores (Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) e Chothia *et al.*, Nature 342:877-883 (1989)) observaram que certas sub porções nas CDR de Kabat adoptam conformações de esqueleto polipeptídico praticamente idênticas, a despeito da grande diversidade ao nível da sequência de aminoácidos. Estas subporções foram designadas como L1, L2 e L3 ou H1, H2 e H3 onde o "L" e o "H" designam as regiões de cadeia leve e as de cadeia pesada, respectivamente. Estas regiões podem ser referidas como as CDR de Chothia, que têm limites que se sobrepõem às CDR de Kabat. Outros limites definindo as CDR que se sobrepõem às CDR de Kabat foram descritos por Padlan (*FASEB J.* 9:133-139 (1995)) e MacCallum (*J Mol Biol* 262(5):732-45 (1996)). Ainda outras definições de limites de CDR podem não seguir rigorosamente um dos sistemas anteriores, mas no entanto sobrepor-se-ão às CDR de Kabat, embora possam ser encurtadas ou prolongadas à luz da previsão ou observações experimentais de que resíduos ou grupos de resíduos particulares ou mesmo a totalidade das CDR não afectam significativamente a ligação ao antigénio. Os métodos aqui usados podem utilizar as CDR definidas de acordo com qualquer desses sistemas, embora as concretizações preferidas usem as CDR definidas por Kabat ou por Chothia.

Da maneira aqui usada, o termo resíduo "canónico" refere-se a um resíduo numa CDR ou numa região de estrutura que define uma estrutura de CDR canónica particular da maneira definida por Chothia *et al.* (*J. Mol. Biol.* 196:901-907 (1987); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 227:799

(1992)). De acordo com Chothia *et al.*, porções críticas das CDR de muitos anticorpos têm conformações de esqueleto peptídico praticamente idênticas, a despeito da grande diversidade ao nível da sequência de aminoácidos. Cada estrutura canónica especifica principalmente um conjunto de ângulos de torção do esqueleto peptídico para um segmento contínuo de resíduos de aminoácido que formam uma laçada.

Da maneira aqui usada, os termos "dador" e "anticorpo dador" referem-se a um anticorpo que proporciona uma ou mais CDR. Numa concretização preferida, o anticorpo dador é um anticorpo de uma espécie diferente do anticorpo do qual as regiões de estrutura são obtidas ou derivadas. No contexto de um anticorpo humanizado, o termo "anticorpo dador" refere-se a um anticorpo não humano que proporciona uma ou mais CDR.

Da maneira aqui usada, o termo "estrutura" ou "sequência de estrutura" refere-se ás sequências remanescentes de uma região variável, subtraídas as CDR. Em virtude da definição exacta de uma sequência de CDR poder ser determinada usando sistemas diferentes, o significado de uma sequência de estrutura está sujeito a interpretações correspondentemente diferentes. As seis CDR (CDR-L1, -L2, e -L3 da cadeia leve e CDR-H1, -H2, e -H3 da cadeia pesada) também dividem as regiões de estrutura na cadeia leve e na cadeia pesada em quatro sub-regiões (FR1, FR2, FR3 e FR4) em cada cadeia, em que CDR1 está posicionada entre FR1 e FR2, CDR2 entre FR2 e FR3, e CDR3 entre FR3 e FR4. Sem especificar as sub-regiões particulares como FR1, FR2, FR3 ou FR4, uma região de estrutura, da maneira referida por outros, representa as FR combinadas na região variável de uma única cadeia de imunoglobulina de ocorrência natural. Da maneira aqui usada, uma FR representa uma das quatro sub-regiões, e FRs representa duas ou mais das quatro sub-regiões que constituem uma região de estrutura.

Sequências aceitadoras de cadeia pesada e cadeia leve humanas são conhecidas na técnica.

Da maneira aqui usada, o termo "gene de anticorpo da linha germinal" ou "fragmento de gene" refere-se a uma sequência de imunoglobulina codificada por células não linfóides que não sofreu o processo de maturação que leva ao

rearranjo e mutação genéticos para expressão de uma imunoglobulina particular. (Ver, por exemplo, Shapiro *et al.*, *Crit. Rev. Immunol*. 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis *et al.*, *Adv Exp Med Biol*. 484:13-30 (2001)). Uma das vantagens proporcionadas por várias concretizações da presente invenção decorre da observação de que genes de anticorpos da linhas germinal mais provavelmente conservam características de estruturas da sequência de aminoácidos essenciais de indivíduos na espécie do que genes de anticorpos maduros, e consequentemente menos provavelmente serão reconhecidos como não próprios quando usado nestas espécies.

Da maneira aqui usada, o termo resíduos "chave" refere-se a certos resíduos na região variável que têm mais impacto na especificidade e/ou afinidade de ligação de um anticorpo, em particular um anticorpo humanizado. Um resíduo chave inclui, mas sem limitações, um ou mais dos seguintes: um resíduo que está adjacente a uma CDR, um local de glicosilação potencial (que pode ser tanto local de N-glicosilação como de O-glicosilação), um resíduo raro, um resíduo capaz de interagir com o antigénio, um resíduo capaz de interagir com uma CDR, um resíduo canónico, um resíduo de contacto entre a região variável da cadeia pesada e a região variável da cadeia leve, um resíduo na zona de Vernier, e um resíduo na região que se sobrepõe entre a definição de Chothia de uma CDR1 da cadeia pesada variável e a definição de Kabat da primeira estrutura da cadeia pesada.

Da maneira aqui usada, o termo "anticorpo humanizado" refere-se especificamente a um anticorpo ou uma sua variante, um seu derivado, análogo ou fragmento, que se ligam imunoespecificamente a um antigénio de interesse e que compreendem uma região de estrutura (FR) tendo substancialmente a sequência de aminoácidos de um anticorpo humano e uma região determinante de complementaridade (CDR) tendo substancialmente a sequência de aminoácidos de um anticorpo não humano. Da maneira aqui usada, o termo "substancialmente" no contexto de uma CDR refere-se a uma CDR tendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% idêntica à sequência de aminoácidos de uma CDR de anticorpo não humano. Um

anticorpo humanizado compreende substancialmente todos de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis (Fab, Fab', $F(ab')_2$, FabC, Fv) em que todas ou substancialmente todas as regiões CDR correspondem àquelas de uma imunoglobulina não humana (isto é, anticorpo dador) e todas ou substancialmente todas as regiões de estrutura são as de uma sequência de imunoglobulina de consenso humana. Preferivelmente, um anticorpo humanizado também compreende pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina humana. Em algumas concretizações, um anticorpo humanizado contém tanto a cadeia leve, como pelo menos o domínio variável de uma cadeia pesada. O anticorpo também pode incluir as regiões CH1, de charneira, CH2, CH3 e CH4 da cadeia pesada. Em algumas concretizações, um anticorpo humanizado contém apenas uma cadeia leve humanizada. Em algumas concretizações, um anticorpo humanizado contém apenas uma cadeia pesada humanizada. Em concretizações específicas, um anticorpo humanizado contém apenas um domínio variável humanizado de uma cadeia leve e/ou cadeia pesada humanizada.

O anticorpo humanizado pode ser seleccionado de qualquer classe de imunoglobulinas, incluindo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, e qualquer subclasse, incluindo sem limitação, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

As regiões de estrutura e CDR de um anticorpo humanizado não precisam de corresponder precisamente às sequências parentais, por exemplo, a CDR do anticorpo dador ou a estrutura de consenso podem estar mutadas por substituição, inserção e/ou deleção de pelo menos um resíduo de aminoácido de maneira que o resíduo da CDR ou da estrutura nesse local não corresponde exactamente nem ao anticorpo dador nem à estrutura de consenso. Numa concretização preferida, tais mutações, contudo, não serão extensas. Geralmente, pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, e o mais preferivelmente pelo menos 95% dos resíduos do anticorpo humanizado corresponderão aos das sequências de FR e CDR parentais. Da maneira aqui usada, o termo "estrutura de consenso" refere-se à região de estrutura na sequência de imunoglobulina de consenso. Da maneira aqui usada, o termo

"sequência de imunoglobulina de consenso" refere-se à sequência formada pelos aminoácidos (ou nucleótidos) que ocorrem mais frequentemente numa família de sequências de imunoglobulina relacionadas (ver por exemplo, Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemanha 1987). Numa família de imunoglobulinas, cada posição na sequência de consenso é ocupada pelo aminoácido que ocorre mais frequentemente nesta posição na família. Quando dois aminoácidos ocorrem com igual frequência, ambos qualquer um pode ser incluído na sequência de consenso.

Da maneira aqui usada, zona de "Vernier" refere-se a um subconjunto de resíduos de estrutura que podem ajustar a estrutura da CDR e fazer o ajuste fino à compatibilidade com o antigénio, como descrito por Foote e Winter (1992, *J. Mol. Biol.* 224:487-499). Resíduos da zona de Vernier formam uma camada subjacente às CDR e podem afectar a estrutura das CDR e a afinidade do anticorpo.

O termo "epítopo" inclui qualquer determinante polipeptídico capaz de ligação específica a uma imunoglobulina. Em certas concretizações, os determinantes epitópicos incluem agrupamentos de superfície quimicamente activos de moléculas tais como aminoácidos, cadeias laterais de açúcar, fosforilo ou sulfonilo, e, em certas concretizações, podem ter características estruturais tridimensionais específicas, e/ou características de carga específicas. Um epítopo é uma região de um antigénio que é ligada por um anticorpo. Em certas concretizações, diz-se que um anticorpo se liga especificamente a um antigénio quando preferencialmente reconhece o antigénio seu alvo numa mistura complexa de proteínas e/ou macromoléculas.

O termo "polinucleótido" da maneira referida aqui significa uma forma polimérica de dois ou mais nucleótidos, sejam ribonucleótidos ou desoxinucleótidos ou uma forma modificada de qualquer destes tipos de nucleótidos. O termo inclui formas em cadeia simples e dupla de ADN, mas preferivelmente é ADN de cadeia dupla.

O termo "polinucleótido isolado" da maneira aqui usada significará um polinucleótido (por exemplo, de origem genómica, ADNc, ou sintética, ou qualquer sua combinação) em que, em virtude da sua origem, o "polinucleótido isolado"

não está associado à totlidade ou a uma porção de um polinucleótido com o qual o "polinucleótido isolado" se encontra na natureza; está operativamente ligado a um polinucleótido ao qual não está ligado na natureza; ou não ocorre na natureza como parte de uma sequência maior.

O termo "vector", da maneira aqui usada, pretende referir uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar um outro ácido nucleico ao qual foi ligada. Um tipo de vector é um "plasmídeo", que se refere a um ADN de cadeia dupla circular ao qual podem ser ligados segmentos de ADN adicionais. Um outro tipo de vector é um vector viral, em que segmentos de ADN adicionais podem ser ligados no genoma viral. Certos vectores são capazes de replicação autónoma numa célula hospedeira na qual são introduzidos (por exemplo, vectores bacterianos tendo uma origem de replicação bacteriana e vectores de mamífero epissómicos). Outros vectores (por exemplo, vectores não epissómicos de mamífero) podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira mediante introdução na célula hospedeira, e dessa maneira são replicados juntamente com o genoma do hospedeiro. Além disso, certos vectores são capazes de dirigir a expressão de genes aos quais estão operativamente ligados. Tais vectores são referidos aqui como "vectores de expressão recombinantes" (ou simplesmente, "vectores de expressão"). De um modo geral, os vectores de expressão com utilidade em técnicas de ADN recombinante são frequentemente na forma de plasmídeos. No presente fascículo, "plasmídeo" e "vector" podem ser usados indiferentemente pois o plasmídeo é a forma de vector mais comummente usada. Contudo, pretende-se incluir na invenção estas outras formas de vectores de expressão, tais como vectores virais (por exemplo, retrovírus, adenovírus e vírus adeno-associado defeituosos para replicação), que servem funções equivalentes.

O termo "ligado operativamente" refere-se a uma justaposição em que os componentes descritos estão numa relação que lhes permite funcionar da sua maneira visada. Uma sequência de controlo "ligada operativamente" a uma sequência de codificação está ligada de uma maneira tal que a expressão da sequência de codificação é obtida em condições compatíveis com as sequências de controlo. Sequências "ligadas operativamente" incluem tanto sequências

de controlo da expressão que são contíguas ao gene de interesse, como sequências de controlo de expressão que actuam em *trans* ou à distância para controlar o gene de interesse. O termo "sequência de controlo de expressão" da maneira aqui usada refere-se a sequências polinucleotídicas que são necessárias para realizar a expressão e o processamento de sequências de codificação às quais estão ligadas. Sequências de controlo de expressão incluem sequências de iniciação, terminação, promotoras e melhoradoras da transcrição apropriadas; sinais de processamento de ARN eficientes tais como sinais de *splicing* e poliadenilação; sequências que estabilizam o ARNm citoplasmático; sequências que melhoram a eficiência da tradução (isto é, sequência de consenso de Kozak); sequências que melhoram a estabilidade da proteína; e quando desejado, sequências que melhoram a secreção da proteína. A natureza de tais sequências de controlo difere dependendo do organismo hospedeiro; em procariotas, estas sequências de controlo de um modo geral incluem sequências promotoras, locais de ligação ao ribossoma e de terminação da transcrição; em eucariotas, de um modo geral, estas sequências de controlo incluem sequências promotoras e de terminação da transcrição. O termo "sequências de controlo" deve para incluir componentes cuja presença é essencial para expressão e processamento, e também pode incluir componentes adicionais cuja presença é vantajosa, por exemplo, sequências de comando e sequências parceiras de fusão.

"Transformação", da maneira aqui definida, refere-se a qualquer processo pelo qual ADN exógeno entra numa célula hospedeira. A transformação pode ocorrer em condições naturais ou artificiais usando vários métodos bem conhecidos na técnica. A transformação pode basear-se em qualquer método conhecido para inserção de sequências de ácido nucleico estranhas numa célula hospedeira procariota ou eucariota. O método é seleccionado com base na célula hospedeira que é transformada e pode incluir, mas sem limitações, infecção viral, eletroporação, lipofecção e bombardeamento de partículas. Estas células "transformadas" incluem células estavelmente transformadas em que o ADN inserido é capaz de replicação na forma de um plasmídeo que replica autonomamente ou como parte do cromossoma do hospedeiro. Também incluem células que expressam

transientemente o ADN ou o ARN inseridos por períodos de tempo limitado.

O termo "célula hospedeira recombinante" (ou simplesmente "célula hospedeira"), da maneira aqui usada, pretende referir uma célula em que ADN exógeno foi introduzido. Deve-se entender que estes termos pretedem referir não apenas a célula particular em questão, mas, também a progenia desta célula. Em virtude de certas modificações poderem ocorrer em gerações sucessivas tanto devido a mutação como a influências ambientais, a progenia pode, de facto, não ser idêntica à célula-mãe, mas ainda assim está incluída no escopo do termo "célula hospedeira" da maneira aqui usada. Preferivelmente as células hospedeiras incluem células procariotas e eucariotas seleccionadas de qualquer dos reinos de vida. As células eucariotas preferidas incluem células protistas, fúngicas, vegetais e animais. O mais preferivelmente as células hospedeiras incluem, mas sem limitações, a linha celular procariota de *E.coli*; as linhas celulares de mamífero CHO, HEK 293 e COS; a linha celular de insecto Sf9; e a célula fúngica *Saccharomyces cerevisiae*.

Podem ser usadas técnicas padrão para ADN recombinante, síntese de oligonucleótidos, e cultura e transformação de tecidos (por exemplo, eletroporação, lipofecção). Reacções enzimáticas e técnicas de purificação podem ser realizadas de acordo com especificações do fabricante ou como geralmente realizadas na técnica ou da maneira aqui descrita. As técnicas e procedimentos anteriores podem ser de um modo geral realizados de acordo com o método convencionais bem conhecidos na técnica e como descrito em várias referências genéricas e mais específicas que são citadas e discutidas ao longo do presente fascículo. Ver por exemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), que é incorporado aqui por referência com qualquer propósito.

"Organismo transgénico", como conhecido na técnica e da maneira aqui usada, refere-se a um organismo tendo células que contêm um transgene, em que o transgene introduzido no organismo (ou um antecessor do organismo) expressa um

polipéptido não naturalmente expresso no organismo. Um "transgene" é uma construção de ADN, que é estável e está operativamente integrada no genoma de uma célula a partir da qual um organismo transgénico se desenvolve, dirigindo a expressão de um produto génico codificado num ou mais tipos de células ou tecidos do organismo transgénico.

Métodos de produção de anticorpos da invenção são descritos adiante. É feita aqui distinção entre abordagens *in vivo*, abordagens *in vitro* ou uma combinação de ambas.

Alguns métodos de produção de anticorpos da invenção são descritos adiante. É feita aqui distinção entre abordagens *in vivo*, abordagens *in vitro* ou uma combinação de ambas.

Abordagens *in vivo*

Dependendo do tipo de anticorpo desejado, vários animais hospedeiros podem ser usados para imunização *in vivo*. Pode ser usado um hospedeiro que expressa por si próprio uma versão endógena do antigénio de interesse. Alternativamente, é possível usar um hospedeiro que foi tornado deficiente numa versão endógena do antigénio de interesse. Por exemplo, mostrou-se que ratinhos que foram tornados deficientes numa proteína endógena particular por meio de recombinação homóloga no gene endógeno correspondente (isto é, ratinhos *knockout*) geram uma resposta humoral à proteína com a qual foram imunizados e portanto são susceptíveis de ser usados para produção de anticorpos monoclonais de alta afinidade para com a proteína (ver, por exemplo, Roes, J. *et al.* (1995) J. *Immunol. Methods* 183:231-237; Lunn, M.P. *et al.* (2000) *J. Neurochem.* 75:404-412).

Uma multiplicidade de mamíferos não humanos são hospedeiros adequados para produção de anticorpos a fim de produzir anticorpos não humanos da invenção. Estes incluem ratinhos, ratos, galinhas, camelídeos, coelhos, carneiros e cabras (e suas versões *knockout*), embora seja dada preferência a ratinhos para a produção de hibridomas. Além disso, um hospedeiro animal não humano que expressa um repertório de anticorpos humanos pode ser usado para produzir anticorpos essencialmente humanos contra um

antigénio humano com dupla especificidade. Animais não humanos deste tipo incluem animais transgénicos (por exemplo, ratinhos) que são portadores de transgenes de imunoglobulina humana (ratinhos quiméricos hu-PBMC SCID) e quimeras humano/ratinho por irradiação que se descrevem com mais detalhes adiante.

De acordo com uma concretização, o animal imunizado com globulómero A (20-42) ou um seu derivado é um mamífero não humano, preferivelmente um ratinho, que é transgénico devido a genes de imunoglobulina humana de maneira que o dito mamífero não humano produz anticorpos humanos mediante estímulo antigénico. Tipicamente, são introduzidos nestes animais transgenes de imunoglobulina para cadeias pesadas e leves com configuração da linha germinal humana que foram alterados de maneira a que os seus *loci* de cadeia pesada e leve endógenos sejam inactivos. Se estes animais são estimulados com antigénio (por exemplo, com um antigénio humano), anticorpos derivados das sequências de imunoglobulina humana (anticorpos humanos) são produzidos. É possível preparar a partir dos linfócitos destes animais, anticorpos monoclonais humanos por meio de tecnologia de hibridoma padronizada. Para uma descrição adicional de ratinhos transgénicos com imunoglobulinas humanas e seu uso na produção de anticorpos humanos, ver, por exemplo, US 5.939.598, WO 96/33735, WO 96/34096, WO 98/24893 e WO 99/53049 (Abgenix Inc.), e US 5.545.806, US 5.569.825, US 5.625.126, US 5.633.425, US 5.661.016, US 5.770.429, US 5.814.318, US 5.877.397 e WO 99/45962 (Genpharm Inc.); ver também MacQuitty, J.J. e Kay, R.M. (1992) *Science* 257:1188; Taylor, L.D. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:6287-6295; Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368:856-859; Lonberg, N. e Huszar, D. (1995) Int. *Rev. Immunol.* 13:65-93; Harding, F.A. e Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546; Fishwild, D.M. *et al.* (1996) *Nature Biothecnology* 14:845-851; Mendez, M.J. *et al.* (1997) *Nature Genetics* 15:146-156; Green, L.L. e Jakobovits, A. (1998) *J. Exp. Med.* 188:483-495; Green, L.L. (1999) J. *Immunol. Methods,* 20231:11-23; Yang, X.D. *et al.* (1999) *J. Leukoc. Biol.* 66:401-410; Gallo, M.L. *et al.* (2000) *Eur. J. Immunol.* 30:534-540.

De acordo com uma outra concretização, o animal que é imunizado com globulómero Aβ (20-42) ou um seu derivado pode ser um ratinho com imunodeficiência combinada grave (SCID), que foi reconstituído com células mononucleares de sangue periférico humanas ou células linfóides ou seus precursores. Estes ratinhos que são referidos como ratinhos quiméricos hu-PBMC SCID produzem respostas de imunoglobulina humana mediante estímulo antigénico, como foi demonstrado. Para uma descrição adicional destes ratinhos e do seu uso para gerar anticorpos, ver, por exemplo, Leader, K.A. *et al.* (1992) *Immunology* 76:229-234; Bombil, F. *et al. (1996) Immunobiol.*195:360-375; Murphy, W.J. *et al.* (1996) *Semin. Immunol.* 8:233-241; Herz, U. *et al.* (1997) Int. A*rch. Allergy Immunol.* 113:150-152; Albert, S.E. *et al.* (1997) J. *Immunol* 159:1393-1403; Nguyen, H. *et al.* (1997) *Microbial. Immunol.* 41:901-907; Arai, *K. et al.* (1998) *J. Immunol. Methods* 217:79-85; Yoshinari, K. e Arai, K. (1998) *Hybridoma* 17:41-45; Hutchins, W.A. *et al.* (1999) *Hybridoma* 18:121-129; Murphy, W.J. *et al.* (1999) *Clin. Immunol.* 90:22-27; Smith*son,* S.L. *et al.* (1999) *Mol. Immunol.* 36:113-124; *Chamat,* S. *et al.* (1999) *J. Infect. Diseases* 180:268-277; e Heard, C. *et al.* (1999) *Molec. Med. 5:35-45.*

De acordo com uma outra concretização, o animal que é imunizado com globulómero Aβ (20-42) ou um seu derivado é um ratinho que foi tratado com um dose letal de irradiação de corpo inteiro, em seguida protegido da radiação com células da medula óssea de ratinhos com imunodeficiência combinada grave (SCID) e subsequentemente transplantado com linfócitos humanos funcionais. Este tipo de quimera, referido como o sistema Trimera, é usado a fim de produzir anticorpos monoclonais humanos por imunização dos ditos ratinhos com o antigénio de interesse e em seguida produzindo anticorpos monoclonais usando a tecnologia de hibridomas padronizada. Para uma descrição adicional destes ratinhos e do seu uso para gerar anticorpos, ver, por exemplo, Eren, R. *et al.* (1998) *Immunology* 93:154-161; Reisner, Y e Dagan, S. (1998) *Trends Biotechnol.* 16:242-246; Ilan, E. *et al.* (1999) *Hepatology* 29:553-562; e Bocher, W.O. *et al.* (1999) *Immunology* 96:634-641.

Partindo das células produtoras de anticorpos geradas *in vivo*, podem ser produzidos anticorpos monoclonais por

meio de técnicas padronizadas tais como a técnica do hibridoma originalmente descrita por Kohler e Milstein (1975, *Nature* 256:495-497) (*ver* também Brown *et al.* (1981) *J. Immunol* 127:539-46; Brown *et al.* (1980) *J Biol Chem* 255:4980-83; Yeh *et al.* (1976) *PNAS* 76:2927-31; e Yeh *et al.* (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75). A tecnologia de produção de hibridomas de anticorpos monoclonais é suficientemente conhecida (*ver* de um modo geral R.H. Kenneth, *em Monoclonal Antibodies: A New Dimension in Biological Analyses,* Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); E.A. Lerner (1981) *Yale J. Biol. Med.,* 54:387-402; M.L. Gefter *et al.* (1977) *Somatic Cell Genet.,* 3:231-36). Resumidamente, uma linha celular imortalizada (tipicamente um mieloma) é fundida com linfócitos (tipicamente esplenócitos ou células de nódulos linfáticos ou linfócitos de sangue periférico) de um mamífero imunizado com o globulómero A da invenção ou seus derivados, e os sobrenadantes da cultura das células de hibridoma resultantes são rastreados a fim de identificar um hibridoma que produz um anticorpo monoclonal da presente invenção. Qualquer dos muitos protocolos bem conhecidos para fundir linfócitos e linhas celulares imortalizadas pode ser aplicado com este propósito (ver também G. Galfre *et al.* (1977) *Nature* 266:550-52; Gefter *et al. Somatic Cell Genet.*, citado acima; Lerner, Yale *J. Biol. Med.*, citado acima; Kenneth, *Monoclonal Antibodies*, citado acima). Além disso, os técnicos especializados perceberão que existem diversas variações a estes métodos que são da mesma forma úteis. Tipicamente, a linha celular imortalizada (por exemplo, uma linha celular de mieloma) é derivada da mesma espécie de mamífero que os linfócitos. Por exemplo, podem ser estabelecidos hibridomas de murino fundindo linfócitos de um ratinho imunizado com uma preparação imunogénica da invenção com uma linha celular de ratinho imortalizada. Linhas celulares imortalizada preferidas são linhas celulares de mieloma de ratinho que são sensíveis ao meio de cultura contendo hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT). Qualquer de várias linhas celulares de mieloma pode ser usada à partida como parceiro de fusão, por exemplo, as linhas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 ou Sp2/O-Ag14. Estas linhas celulares de mieloma encontram-se disponíveis na American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD. Tipicamente, células de

mieloma de ratinho sensíveis a HAT são fundidas com esplenócitos de ratinho usando polietilenoglicol (PEG). As células de hibridoma resultantes da fusão são em seguida selecionadas usando meio HAT, dessa maneira matando células não fundidas e células de mieloma improdutivamente fundidas (os esplenócitos não fundidos morrem após vários dias em virtude de não estarem transformados). As células de hibridoma que produzem anticorpos monoclonais da invenção são identificadas por rastreio dos sobrenadantes da cultura dos hibridomas quanto a estes anticorpos, por exemplo, usando um ensaio *dot blot* como descrito acima e no exemplo 8 a fim de selecionar os anticorpos que têm as afinidades de ligação como definido acima.

Os anticorpos monoclonais 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1 e 3B10 foram todos gerados usando a abordagem *in vivo* descrita acima e portanto são obteníveis a partir de um hibridoma da maneira aqui definida.

Da mesma forma, o dito hibridoma pode ser usado como uma fonte de ácido nucleico que codifica cadeias leves e/ou pesadas a fim de produzir recombinantemente anticorpos da presente invenção, da maneira descrita adiante com mais detalhes.

Abordagens *in vitro*

Como alternativa à produção de anticorpos da invenção por imunização e selecção, os anticorpos da invenção podem ser identificados e isolados por rastreio de bibliotecas combinatórias de imunoglobulinas recombinantes com globulómero A (20-42) ou seus derivados, para dessa maneira isolar membros da biblioteca de imunoglobulinas que têm a afinidade de ligação exigida. Estojos para geração e rastreio de bibliotecas de exibição estão comercialmente disponíveis (por exemplo, o Recombinant Phage Antibodie System da Pharmacia, n.º de catálogo 27-9400-01; e o SurfZAP® Phage Display Kit da Stratagene, n.º de catálogo 240612). Em muitas concretizações, a biblioteca de exibição é uma biblioteca de scFv ou uma biblioteca de Fab. A técnica de exibição em fagos para rastreio de bibliotecas de anticorpos recombinantes foi adequadamente descrita. Exemplos de métodos e compostos que podem ser usados particularmente, e de forma vantajosa, para gerar e

rastrear as bibliotecas de exibição de anticorpos, podem ser encontrados, por exemplo, em McCafferty *et al.* WO 92/01047, US 5.969.108 e EP 589 877 (descreve em particular exibição de scFv), Ladner *et al.* US 5.223.409, US 5.403.484, US 5.571.698, US 5.837.500 e EP 436 597 (descreve fusão de pIII, por exemplo); Dower *et al.* WO 91/17271, US 5.427.908, US 5.580.717 e EP 527 839 (descreve em particular a exibição de Fab); *Winter et al.* Publicação Internacional WO 92/20791 e EP 368,684 (descreve em particular a clonagem de sequências para domínios variáveis de imunoglobulina); Griffiths *et al.* US 5.885.793 e EP 589877 (descreve em particular o isolamento de anticorpos humanos contra antigénios humanos usando bibliotecas recombinantes); Garrard *et al.* WO 92/09690 (descreve em particular técnicas de expressão em fagos); Knappik *et al.* WO 97/08320 (descreve a biblioteca de anticorpos recombinantes humanos HuCal); Salfeld *et al.* WO 97/29131, (descreve a produção de um anticorpo humano recombinante contra um antigénio humano (factor alfa de necrose tumoral humano) e também maturação de afinidade *in vitro* do anticorpo recombinante) e pedido de patente provisório U.S. de Salfeld *et al. n.º* 60/126.603 e os pedidos de patente neste baseados (da mesma forma descreve a produção de anticorpos humanos recombinantes contra antigénios humanos (interleucina-12 humana), e também maturação de afinidade *in vitro* do anticorpo recombinante).

Descrições adicionais de rastreios de bibliotecas de anticorpos recombinantess podem ser encontradas em publicações científicas tais como Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; *Hay et al.* (1992) *Hum Antibod Hybridomas 3:81-85;* Huse *et al. (1989) Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J Mol Biol 226:889-896;* Clarkson *et al.* (1991) *Nature 352:624-628;* Gram *et al.* (1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrard *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; Barbas *et al.* (1991) *PNAS 88:7978-7982;* McCafferty *et al. Nature* (1990) 348:552-554; e Knappik *et al.* (2000) *J. Mol. Biol. 296:57-86.*

Como alternativa ao uso de sistemas de exibição em bacteriófagos, bibliotecas de anticorpos recombinantes podem ser expressas na superfície de células de levedura ou de células bacterianas. WO 99/36569 descreve métodos de

preparação e rastreio de bibliotecas expressas na superfície de células de levedura. WO 98/49286 descreve com mais detalhes métodos de preparação e rastreio de bibliotecas expressas na superfície de células bacterianas.

Em todas as abordagens *in vitro*, um processo de selecção para enriquecimento em anticorpos recombinantes com as propriedades desejadas faz parte integral do processo, que é de um modo geral referido como "*panning*" e frequentemente toma a forma de cromatografia de afinidade sobre colunas em cuja matriz a estrutura alvo foi ligada. Moléculas candidatas promissoras são em seguida submetidas a determinação individual das suas afinidades absoluta e/ou relativa, preferivelmente por meio de um ensaio *dot blot* padronizado, como descrito acima e no exemplo 8.

Uma vez identificado e suficientemente caracterizado um anticorpo de interesse de uma biblioteca combinatória, as sequências de ADN que codificam as cadeias leve e pesada do dito anticorpo são isoladas por meio de técnicas de biologia molecular padronizadas, por exemplo, por meio de amplificação por PCR de ADN da embalagem de exibição (por exemplo, o fago) que foi isolado durante o rastreio da biblioteca. Sequências de nucleótidos de genes para cadeias de anticorpos leves e pesadas, que podem ser usadas para preparar iniciadores de PCR, são conhecidas dos técnicos especializados. Uma multiplicidade destas sequências está descrita, por exemplo, em Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services*, NIH publicação No. 91-3242, e na base de dados de sequências da linha germinal humana VBASE.

Um anticorpo ou uma porção de anticorpo da invenção podem ser produzidos expressando recombinantemente os genes para cadeias de imunoglobulina leve e pesada numa célula hospedeira. A fim de expressar recombinantemente um anticorpo, uma célula hospedeira é transfectada com um ou mais vectores de expressão recombinantes portadores de fragmentos de ADN que codificam as cadeias de imunoglobulina leve e pesada do dito anticorpo, expressando dessa maneira as cadeias leve e pesada na célula hospedeira e segregando-as preferivelmente para o meio no qual as ditas

células hospedeiras são cultivadas. Os anticorpos podem ser isolados a partir deste meio. Métodos de ADN recombinante padronizados são usados a fim de obter genes para cadeias de anticorpo pesadas e leves, para inserir os ditos genes em vectores de expressão recombinantes e para introduzir os ditos vectores em células hospedeiras. Métodos deste tipo estão descritos, por exemplo, em Sambrook, Fritsch e Maniatis (eds.), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition,* Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel, F.M. *et al.* (eds.) *Current* Protocolos in Mo*lecular Biology,* Greene Publishing Associates, (1989) e em US 4.816.397 de Boss *et al.*.

Uma vez obtidos fragmentos de ADN que codificam segmentos VH e VL do anticorpo de interesse, os ditos fragmentos de ADN podem ser adicionalmente manipulados usando técnicas de ADN recombinante padronizadas, por exemplo, a fim de converter os genes para regiões variáveis em genes para cadeias de anticorpo de comprimento total, em genes para fragmentos Fab ou num gene de scFv. Estas manipulações compreendem ligar um fragmento de ADN que codifica VL ou VH, operativamente, a um outro fragmento de ADN que codifica uma outra proteína, por exemplo, uma região constante de anticorpo ou um ligante flexível. Deve-se entender o termo "operativamente ligado" como significando que os dois fragmentos de ADN são ligados de uma maneira tal que as sequências de aminoácidos codificadas pelos ditos dois fragmentos de ADN permanecem en enquadramento.

O ADN isolado que codifica a região VH pode ser convertido num gene para uma cadeia pesada de comprimento total ligando operativamente o ADN que codifica a região VH a uma outra molécula de ADN que codifica regiões constantes da cadeia pesada (CH1, CH2 e CH3). As sequências de genes da região constante da cadeia pesada humana são bem conhecidas (ver, por exemplo, Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services,* NIH Publicação No. 91-3242), e os fragmentos de ADN que cobrem as ditas regiões podem ser obtidos por meio de amplificação por PCR padronizada. A região constante da cadeia pesada pode ser uma região constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgE ou IgD, sendo dada preferência a uma região constante

de IgG, em particular IgG1 ou IgG4. Para obter um gene para um fragmento Fab de cadeia pesada, o ADN que codifica VH pode ser operativamente ligado a uma outra molécula de ADN que codifica somente a região constante de cadeia pesada CH1.

O ADN isolado que codifica a região VL pode ser convertido num gene para uma cadeia leve de comprimento total (e um gene para um cadeia leve Fab) ligando operativamente o ADN que codifica VL a uma outra molécula de ADN que codifica a região constante de cadeia leve CL. As sequências de genes da região constante de cadeia leve humana são bem conhecidas (ver Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publicação No. 91-3242), e os fragmentos de ADN que cobrem as ditas regiões podem ser obtidos por meio de amplificação por PCR padronizada. A região constante de cadeia leve pode ser uma região constante capa ou lambda, sendo preferida uma região constante capa.

A fim de gerar um gene de scFv, os fragmentos de ADN que codificam VH e VL podem ser operativamente ligados a um outro fragmento que codifica um ligante flexível, por exemplo, a sequência de aminoácido $(Gly_4\text{-}Ser)_3$ de maneira que as sequências de VH e VL sejam expressas na forma de uma proteína de cadeia simples contínua, sendo as regiões VL e VH ligadas umas às outras através do dito ligante flexível (ver Bird *et al.* (1988) Science 242:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883;* McCafferty *et al., Nature* (1990) 348:552-554).

VH e VL de domínio único tendo as afinidades de ligação como descrito acima podem ser isoladas de bibliotecas de domínios únicos pelos métodos descritos acima. Duas cadeias VH de domínio único (com ou sem CH1) ou duas cadeias VL ou um par de uma cadeia VH e uma cadeia VL com a afinidade de ligação desejada podem ser úteis como aqui descrito para os anticorpos da invenção.

A fim de expressar os anticorpos recombinantes ou porções de anticorpos da invenção, os ADN que codificam cadeias leves e pesadas de comprimento total ou parcial podem ser inseridos em vectores de expressão de maneira a

ligar operativamente os genes às sequências de controlo da transcrição e da tradução apropriadas. Neste contexto, deve-se entender o termo "operativamente ligado" como significando que um gene de anticorpo está ligado num vector de uma maneira tal que as sequências de controlo da transcrição e da tradução no vector cumprem a sua função de regulação da transcrição e da tradução do dito gene de anticorpo.

Convenientemente, o vector de expressão e as sequências de controlo da expressão são escolhidos de maneira a serem compatíveis com a célula hospedeira de expressão usada. O gene para a cadeia leve do anticorpo e o gene para a cadeia pesada do anticorpo podem ser inseridos em vectores separados ou ambos os genes são inseridos no mesmo vector de expressão, sendo este o caso usual. Os genes de anticorpos são inseridos no vector de expressão por meio de métodos padronizados (por exemplo, por ligação de locais de clivagem por restrição complementares no fragmento do gene do anticorpo e no vector, ou por ligação de extremidades lisas, se não estão presentes locais de clivagem por restrição). O vector de expressão pode já possuir sequências para regiões constantes do anticorpo antes da inserção das sequências para as cadeias leve e pesada. Por exemplo, uma abordagem consiste em converter as sequências de VH e VL nos genes de anticorpo de comprimento total inserindo-as em vectores de expressão que já codificam as regiões constantes de cadeia pesada e, respectivamente, leve, dessa maneira ligando operativamente o segmento VH ao(s) segmento(s) CH no vector e também ligando operativamente o segmento VL ao segmento CL no vector.

Adicionalmente, ou alternativamente, o vector de expressão recombinante pode codificar um péptido de sinal que facilita a secreção da cadeia de anticorpo pela célula hospedeira. O gene para a dita cadeia de anticorpo pode ser clonado no vector, dessa maneira ligando o péptido de sinal em enquadramento ao terminal N do gene para a cadeia de anticorpo. O péptido de sinal pode ser um péptido de sinal de imunoglobulina ou um péptido de sinal heterólogo (isto é, um péptido de sinal de uma proteína que não imunoglobulina). Além dos genes para a cadeia de anticorpo, os vectores de expressão da invenção podem ter sequências reguladoras que

controlam a expressão dos genes para a cadeia de anticorpo numa célula hospedeira.

No termo "sequência reguladora" pretende-se incluir promotores, melhoradores e outros elementos de controlo da expressão (por exemplo, sinais de poliadenilação) que controlam a transcrição ou a tradução dos genes para a cadeia de anticorpo. Sequências reguladoras deste tipo estão descritas, por exemplo, em Goeddel; Gene *Expression Technology.: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Os técnicos especializados perceberão que o desenho do vector de expressão que inclui a selecção de sequências reguladoras pode depender de factores tais como a escolha da célula hospedeira a transformar, a intensidade de expressão desejada da proteína, etc. As sequências reguladoras preferidas para expressão em células hospedeiras de mamífero incluem elementos virais que resultam em expressão de proteína constitutiva e forte em células de mamífero, tais como promotores e/ou melhoradores derivados de citomegalovírus (CMV) (tal como o promotor/melhorador de CMV), vírus de símio 40 (SV40) (tal como o promotor/melhorador de SV40), adenovírus (por exemplo, o promotor tardio principal de adenovírus (AdMLP)) e polioma. Para uma descrição adicional de elementos reguladores virais e suas sequências, ver, por exemplo, US 5.168.062 de Stinski, US 4.510.245 de Bell *et al.* e US 4.968.615 de Schaffner *et al.*

Além dos genes para a cadeia de anticorpo e as sequências reguladoras, os vectores de expressão recombinantes da invenção podem ter sequências adicionais tais como as que regulam a replicação do vector em células hospedeiras (por exemplo, origens de replicação) e genes marcadores seleccionáveis. Os genes marcadores seleccionáveis facilitam a selecção de células hospedeiras nas quais o vector foi introduzido (ver, por exemplo, patente US 4.399.216, 4.634.665 e 5.179,017, todos de Axel *et al.*). Por exemplo, é comum um gene marcador selecionável tornar uma célula hospedeira na qual o vector foi inserido resistente a fármacos citotóxicos tais como G418, higromicina ou metotrexato. Os genes marcadores seleccionáveis preferidos incluem o gene para di-hidrofolato-redutase (DHFR) (for uso em células hospedeiras

dhfr⁻ com selecção/amplificação com metotrexato) e o gene *neo* (para selecção com G418).

Para a expressão das cadeias leve e pesada, o(s) vector(s) de expressão(s) que codifica(m) as ditas cadeias pesada e leve é(são) transfectado(s) numa célula hospedeira por meio de técnicas padronizadas. Nas várias formas do termo "transfecção" pretende-se compreender uma multiplicidade de técnicas normalmente usadas para introduzir ADN exógeno numa célula hospedeira procariota ou eucariota, por exemplo, eletroporação, precipitação com fosfato de cálcio, transfecção com DEAE-dextrano, e similares. Embora seja teoricamente possível expressar os anticorpos da invenção tanto em células hospedeiras procariotas como eucariotas, é dada preferência à expressão dos anticorpos em células eucariotas e, em particular, em células hospedeiras de mamífero, uma vez que a probabilidade de um anticorpo correctamente dobrado e imunologicamente activo ser montado e segregado é maior nestas células eucariotas, e em particular em célula de mamífero, do que em célula procariotas. A expressão procariota de genes de anticorpos foi reportada como sendo ineficaz para produção de altos rendimentos do anticorpo activo (Boss, M.A. e Wood, C.R. (1985) *Immunology* Today 6:12-13).

As células hospedeiras de mamífero preferidas para expressar anticorpos recombinantes da invenção incluem células CHO (incluindo a célula CHO dhfr⁻ como descrito em Urlaub e Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad.* Sci. USA 77:4216-4220, que são usadas juntamente com um marcador selecionável de DHFR, da maneira descrita, por exemplo, em R.J. Kaufman e P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS e células SP2. Aquando da introdução de vectores de expressão recombinantes que codificam os genes de anticorpo em células hospedeiras de mamífero, os anticorpos são produzidos cultivando as células hospedeiras até o anticorpo ser expresso nas ditas células hospedeiras ou, preferivelmente, o anticorpo ser segregado para o meio de cultura em que as células hospedeiras crescem. Os anticorpos podem em seguida ser isolados do meio de cultura usando métodos de purificação de proteínas padronizados.

Da mesma forma é possível usar células hospedeiras a fim de produzir porções de anticorpos intactos, tais como fragmentos Fab ou moléculas de scFv. Variações do procedimento descrito acima estão evidentemente incluídos na invenção. Por exemplo, pode-se desejar transfectar uma célula hospedeira com ADN que codifica a cadeia leve ou a cadeia pesada (mas não ambas) de um anticorpo da invenção. Se estiverem presentes as cadeias leves ou as pesadas que não são necessárias para a ligação do antigénio de interesse, então o ADN que codifica essa cadeia leve ou essa cadeia pesada, ou ambas, pode ser removido parcial ou completamente por meio de tecnologia de ADN recombinante. Moléculas expressas estas moléculas de ADN truncadas são da mesma forma incluídas nos anticorpos da invenção. Em adição, é possível produzir anticorpos bifuncionais em que uma cadeia pesada e uma cadeia leve são um anticorpo da invenção e a outra cadeia pesada e a outra cadeia leve têm especificidade para um antigénio diferente do antigénio de interesse, ligando cruzadamente um anticorpo da invenção a um segundo anticorpo por meio de métodos químicos padronizados.

Num sistema preferido para expressão recombinante de um anticorpo da invenção ou de uma sua porção de ligação ao antigénio, um vector de expressão recombinante que codifica tanto a cadeia pesada de anticorpo como a cadeia leve de anticorpo, é introduzido em células CHO dhfr$^-$ por meio de transfecção mediada por fosfato de cálcio. No vector de expressão recombinante, os genes para as cadeias de anticorpo pesada e leve são em cada caso operativamente ligadas a elementos reguladores melhoradores /promotores de CMV, AdMLP, a fim de efectuar uma forte transcrição dos ditos genes. O vector de expressão recombinante também é portador de um gene de DHFR que pode ser usado para seleccionar células CHO dhfr$^-$ transfectadas com o vector, usando selecção/ amplificação com metotrexato. As células hospedeiras transformadas seleccionadas são cultivadas de maneira que as cadeias de anticorpo pesada e leve sejam expressas, e o anticorpo intacto é isolado do meio de cultura. São usadas técnicas de biologia molecular padronizadas a fim de preparar o vector de expressão recombinante, transfectar as células hospedeiras, seleccionar os transformantes, cultivar as ditas células

hospedeiras, e obter o anticorpo a partir do meio de cultura. Assim a invenção refere-se a um método para sintetizar um anticorpo recombinante da invenção cultivando uma célula hospedeira da invenção num meio de cultura adequado até um anticorpo recombinante da invenção ser sintetizado. O método pode além disso compreender o isolamento do dito anticorpo recombinante a partir do dito meio de cultura.

Como alternativa ao rastreio de bibliotecas de anticorpos recombinantes por exibição em fagos, outros métodos conhecidos dos técnicos especializados podem ser usados para o rastreio de grandes bibliotecas combinatórias para identificar os anticorpos da invenção. Basicamente, pode ser empregue qualquer sistema de expressão no qual seja estabelecida uma ligação física próxima entre um ácido nucleico e o anticorpo por ele codificado, e possa ser usado para seleccionar uma sequência de ácido nucleico adequada em virtude das propriedades do anticorpo que codifica.

Num tipo de sistema de expressão alternativo, a biblioteca de anticorpos recombinantes é expressa na forma de fusões de proteína e ARN, como descrito em WO 98/31700 de Szostak e Roberts, e em Roberts, R.W. e Szostak, J.W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12297-12302. Neste sistema, a tradução *in vitro* de ARN sintéticos portadores, no sua extremidade 3', de puromicina, um antibiótico aceitador de peptidilo, gera uma fusão covalente de um ARNm e do péptido ou proteína por eles codificados. Assim um ARNm específico de um mistura complexa de ARNm (por exemplo, uma biblioteca combinatória) pode ser concentrado com base nas propriedades do péptido ou proteína codificados (por exemplo, do anticorpo ou de uma sua porção), tais como ligação do dito anticorpo ou da dita sua porção ao globulómero A (20-42) ou a um seu derivado. As sequência de ácido nucleico que codificam anticorpos ou suas porções e que são obtidas por rastreio destas bibliotecas podem ser expressas por meios recombinantes da maneira acima descrita (por exemplo, em células hospedeiras de mamífero) e podem, além disso, ser submetidas a maturação de afinidade adicional por rastreio em ciclos adicionais de fusões ARNm-péptido, introduzindo mutações na(s) sequência(s) originalmente seleccionada(s), ou usando

outros métodos de maturação por afinidade *in vitro* de anticorpos recombinantes como descrito acima.

Combinações de abordagens *in vivo* e *in vitro*

Os anticorpos da invenção podem da mesma forma ser produzidos usando uma combinação de abordagens *in vivo* e *in vitro* tais como métodos em que se deixa primeiro actuar o globulómero A (20-42) ou um seu derivado sobre um repertório de anticorpos num animal hospedeiro *in vivo* para estimular a produção de anticorpos que se ligam ao globulómero A (20-42) ou ao seu derivado, e em seguida es realizam a selecção do anticorpo e/ou a maturação do anticorpo adicionais (isto é, Optimização) com a ajuda de uma ou mais técnicas *in vitro*. De acordo com uma concretização, um método combinado deste tipo pode compreender primeiramente imunizar um animal não humano (por exemplo, um ratinho, rato, coelho, galinha, camelídeo, carneiro ou cabra ou uma sua versão transgénica ou um ratinho quimérico) com o dito globulómero A (20-42) ou mu seu derivado, para estimular uma resposta de anticorpos contra o antigénio, e em seguida preparar e rastrear uma biblioteca de anticorpos exibidos em fagos usando sequências de imunoglobulina de linfócitos que foram estimulados *in vivo* pela acção do dito globulómero A (20-42) ou derivado. A primeira etapa deste procedimento combinado pode ser realizada como descrito acima para as abordagens *in vivo*, ao passo que a segunda etapa deste procedimento pode ser realizada como descrito acima para as abordagens *in vitro*. Métodos preferidos de hiper-imunização de animais não humanos com subsequente rastreio *in vitro* de bibliotecas de exibição em fagos preparadas a partir dos ditos linfócitos estimulados incluem as descritas por BioSite Inc., ver, por exemplo, WO 98147343, WO 91/17271, US 5.427.908 e US 5.580.717.

De acordo com uma outra concretização, um método combinado compreende primeiramente imunizar um animal não humano (por exemplo, um ratinho, rato, coelho, galinha, camelídeo, carneiro, cabra ou uma sua versão *knockout* e/ou transgénica, ou um ratinho quimérico) com um globulómero A (20-42) da invenção ou um seu derivado, para estimular uma resposta de anticorpos contra o dito globulómero A (20-42)

ou seu derivado, e seleccionar os linfócitos que produzem os anticorpos tendo a especificidade desejada rastreando hibridomas (preparados, por exemplo, a partir dos animais imunizados). Os genes para os anticorpos ou anticorpos de domínio único são isolados a partir dos clones seleccionados (por meio de métodos de clonagem padronizados tais como reacção em cadeia pela polimerase transcritase inversa) e submetidos a maturação de afinidade *in vitro* a fim de melhorar dessa maneira as propriedades de ligação do anticorpo seleccionado ou dos anticorpos seleccionados. A primeira etapa deste procedimento pode ser conduzida como descrito acima para as abordagens *in vivo*, ao passo que a segunda etapa deste procedimento pode ser conduzida como descrito acima para as abordagens *in vitro*, em particular usando métodos de maturação por afinidade *in vitro*, tais como os como descritos em WO 97/29131 e WO 00/56772.

Num método combinado adicional, os anticorpos recombinantes são gerados a partir de linfócitos individuais isolados usando um procedimento que é conhecido dos técnicos especializados como método de anticorpos de linfócitos seleccionados (SLAM) e que está descrito em US 5.627.052, *WO 92/02551* e Babcock, J.S. *et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848.* Neste método, um animal não humano (por exemplo, um ratinho, rato, coelho, galinha, camelídeo, carneiro, cabra, ou uma sua versão transgénica, ou um ratinho quimérico) é primeiramente imunizado *in vivo* com globulómero A (20-42) ou um seu derivado para estimular uma resposta imunitária contra o dito oligómero ou derivado, e em seguida as células individuais que segregam os anticorpos de interesse são seleccionadas usando um ensaio de formação de placas hemolíticas específico para o antigénio. Com esta finalidade, o globulómero ou seu derivado, ou moléculas de interesse estruturalmente relacionadas, podem ser acoplados a eritrócitos de carneiro, usando um ligante tal como biotina, tornado dessa maneira possível identificar células individuais que segregam anticorpos com especificidade adequada usando o ensaio de formação de placas hemolíticas. Após a identificação de células que segregam anticorpos de interesse, os ADNc para as regiões variáveis das cadeias leve e pesada são obtidos a partir das células por PCR com transcritase inversa, e as ditas regiões variáveis podem em

seguida ser expressas em associação com regiões constantes de imunoglobulina adequadas (por exemplo, regiões constantes humanas) em células hospedeiras de mamífero tais como células COS ou CHO. As células hospedeiras transfectadas com as sequências de imunoglobulina amplificadas derivadas de linfócitos seleccionados *in vivo* podem em seguida ser submetidas a análise *in vitro* e selecção *in vitro* adicionais espalhando as células transfectadas, por exemplo, a fim de isolar células que expressam anticorpos com a afinidade de ligação. As sequências de imunoglobulina amplificadas podem além disso ser manipuladas *in vitro*.

Os anticorpos tendo as afinidades exigidas aqui definidas podem ser seleccionados realizando um *dot blot* essencialmente como descrito acima. Resumidamente, o antigénio é ligado a uma matriz sólida, preferivelmente aplicado por pontos numa membrana de nitrocelulose, em diluições em série. O antigénio imobilizado é em seguida colocado em contacto com o anticorpo de interesse seguindo-se a detecção deste último por meio de um anticorpo secundário conjugado com uma enzima e uma reacção calorimétrica; com concentrações definidas de anticorpo e de antigénio, a quantidade de anticorpo ligado permite a determinação da afinidade. Assim, a afinidade relativa de dois diferentes anticorpos para com um alvo, ou de um anticorpo para com dois alvos diferentes, é aqui definida como a relação das quantidades respectivas de anticorpo ligado ao alvo observadas com as duas combinações anticorpo-alvo em condições de *dot blot* de outra forma idênticas.

Anticorpos que se ligam ao mesmo epítopo que os anticorpo monoclonal 5F7, 10F11, 7C6, 4B7, 6A2, 2F2, 4D10, 7E5, 10C1, ou 3B10 podem ser obtidos de uma maneira conhecida per se.

Da mesma maneira que os anticorpos podem ser competitivos, como descrito acima, diferentes estruturas alvo dizem-se aqui “competitivas” relativamente a um anticorpo particular se pelo menos uma dessas estruturas for capaz de reduzir especificamente a ligação mensurável da outra, preferivelmente oferecendo um epítopo sobreposto ou idêntico, mais preferivelmente um epítopo idêntico.

Entidades alvo competitivas são úteis para seleccionar directamente anticorpos em virtude da sua afinidade relativa para com essas estruturas alvo. As afinidades relativas podem assim ser determinadas directamente usando um ensaio de competição em que formas distinguíveis das entidades competitivas, por exemplo, estruturas competitivas marcadas de forma diferente, são colocadas em contacto com o anticorpo de interesse, e a afinidade relativa do anticorpo para com cada uma dessas entidades é deduzida das quantidades relativas dessas entidades que são ligadas pelo anticorpo.

Esta competição pode ser usada para enriquecimento directo em anticorpos possuindo um afinidade relativa desejada para com a entidade alvo, ligando a entidade para a qual se pretende maior afinidade a um suporte de matriz sólida e adicionando ao meio uma quantidade adequada, preferivelmente um excesso molar, da entidade competitiva para a qual se pretende menor afinidade. Assim, os anticorpos que exibem as afinidades relativas desejadas tenderão a ligar-se à matriz mais fortemente do que os outros e podem ser obtidos após eliminar as formas menos desejáveis, por exemplo, lavando com baixas concentrações salinas e em seguida colhendo o anticorpo ligado deslocando-o reversivelmente do seu alvo usando altas concentrações salinas. Se desejado, podem ser realizados diversos ciclos de enriquecimento. Numa concretização particular da invenção, onde o genótipo subjacente a um anticorpo está fisicamente ligado a este anticorpo, por exemplo, num agrupamento de hibridomas ou fagos que exibem antigénios ou células de levedura, o correspondente fenótipo pode ser resgatado.

Numa outra concretização da invenção é usado um *dot blot* modificado onde o antigénio imobilizado compete com uma entidade dissolvida pela ligação ao anticorpo, de maneira que a afinidade relativa do anticorpo pode ser deduzida da percentagem ligada ao antigénio imobilizado.

Porções de anticorpo tais como fragmentos Fab e $F(ab')_2$ podem ser produzidas a partir de anticorpos completos usando técnicas convencionais tais como digestão com papaína ou pepsina. Além do mais, anticorpos, porções de anticorpo e

moléculas de imunoadesão podem ser obtidos usando técnicas de ADN recombinante padronizadas.

A presente invenção também se refere a agentes farmacêuticos (composições) compreendendo um anticorpo da invenção e, opcionalmente, um transportador farmaceuticamente adequado. As composições farmacêuticas da invenção podem além disso conter pelo menos um agente terapêutico adicional, por exemplo, um ou mais agentes terapêuticos adicionais, para o tratamento de uma doença para cujo alívio os anticorpos da invenção são úteis. Se, por exemplo, o anticorpo da invenção se liga a um globulómero da invenção, a composição farmacêutica pode adicionalmente conter um ou mais agentes terapêuticos adicionais úteis para o tratamento de desordens em que a actividade do dito globulómero é importante.

Os transportadores farmaceuticamente adequados incluem quaisquer solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotónicos e retardadores da absorção, e similares, desde que sejam fisiologicamente compatíveis. Os transportadores farmaceuticamente aceitáveis incluem, por exemplo, água, solução salina, solução salina tamponada com fosfato, dextrose, glicerol, etanol e similares, e suas combinações. Em muitos casos, é dada preferência ao uso de agentes isotónicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois tais como manitol ou sorbitol, ou cloreto de sódio além disso. Os transportadores farmaceuticamente adequados podem além disso conter quantidades relativamente pequenas de substâncias auxiliares tais como agentes molhantes ou emulsionantes, conservantes ou tampões, que aumentam a meia-vida ou a eficácia dos anticorpos.

As composições farmacêuticas podem ser adequadas para administração parentérica, por exemplo. Aqui, os anticorpos são preparados preferivelmente como soluções injectáveis com um teor do anticorpo de 0,1 - 250 mg/mL. As soluções injectáveis podem ser preparadas em forma líquida ou liofilizada, sendo a forma de dosagem um vidro ou frasco de sílex, um ampola ou um seringa cheia. O tampão pode conter L-histidina (1 - 50 mM, preferivelmente 5 - 10 mM) e ter um pH de 0,5 - 7,0, preferivelmente de 6,0. Tampões adequados

adicionais incluem, sem se lhes limitar, tampões de succinato de sódio, citrato de sódio, fosfato de sódio ou fosfato de potássio. Cloreto de sódio pode ser usado a fim de ajustar a tonicidade da solução a uma concentração de 0 - 300 mM (preferivelmente 150 mM para um forma de dosagem líquida). Crioprotectores, por exemplo, sacarose (por exemplo, 0 - 10%, preferivelmente 0,5 - 1,0%) também podem ser incluídos para uma forma de dosagem liofilizada. Outros crioprotectores adequados são a trealose e a lactose. Enchimento, por exemplo, manitol (por exemplo, 1 - 10%, preferivelmente 2 - 4%) podem também ser incluídas para um forma de dosagem liofilizada. Estabilizantes, por exemplo, L-metionina (por exemplo, 51 - 50 mM, preferivelmente 5 - 10 mM) podem ser usados tanto em formas de dosagem líquidas como liofilizadas. Enchimentos adequados adicionais são a glicina e a arginina. Agentes tensioactivos, por exemplo, polissorbato 80 (por exemplo, 0 - 0,05%, preferivelmente 0,005 - 0,01%), podem também ser usados. Agentes tensioactivos adicionais são polissorbato 20 e BRIJ.

As composições da invenção podem ter uma multiplicidade de formas. Estas incluem formas de dosagem líquida, semi-sólida e sólida, tais como soluções líquida (por exemplo, soluções injectáveis e infundíveis), dispersões ou suspensões, comprimidos, pílulas, pós, lipossomas e supositórios. A forma preferida depende do tipo de administração visado e da aplicação terapêutica. Tipicamente, é dada preferência às composições na forma de soluções injectáveis ou infundíveis, por exemplo, composições que são similares a outros anticorpos para imunização passiva de seres humanos. A via de administração preferida é a parentérica (por exemplo, intravenosa, subcutânea, intraperitoneal ou intramuscular). De acordo com uma concretização preferida, o anticorpo é administrado por infusão ou injecção intravenosas. De acordo com uma outra concretização preferida, o anticorpo é administrado por injecção intramuscular ou subcutânea.

As composições terapêuticas têm tipicamente que ser estéreis e estáveis em condições de preparação e armazenamento. As composições podem ser formuladas como soluções, microemulsões, dispersões, lipossomas ou outras estruturas ordenadas adequadas para altas concentrações de

substância activa. As soluções injectáveis estéreis podem ser preparadas introduzindo o composto activo (isto é, o anticorpo) na quantidade exigida num solvente adequado, onde apropriado com um ou uma combinação dos ingredientes supramencionados, conforme exigido, e em seguida esterilizando por filtração a dita solução. As dispersões são geralmente preparadas introduzindo o composto activo num veículo estéril contendo um meio de dispersão básico e, onde apropriado, outros ingredientes exigidos. No caso de um pó liofilizado estéril para preparar soluções injectáveis estéreis, a secagem a vácuo e a secagem por pulverização são métodos preferidos de preparação, que produzem um pó do ingrediente activo e, onde apropriado, de outros ingredientes desejados, a partir de uma solução previamente esterilizada por filtração. A escoabilidade correcta de uma solução pode ser mantida usando, por exemplo, um revestimento tal como lecitina, mantendo, no caso de dispersões, o tamanho de partícula exigido ou usando agentes tensioactivos. Uma absorção prolongada de composições injectáveis pode ser obtida introduzindo adicionalmente na composição um agente que atrasa a absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina.

Os anticorpos da invenção podem ser administrados por uma multiplicidade de métodos conhecidos dos técnicos especializados, embora o tipo de administração preferido para muitas aplicações terapêuticas seja injecção subcutânea, injecção intravenosa ou infusão. Os técnicos especializados perceberão que a via e/ou tipo de administração dependerão do resultado desejado. De acordo com concretizações particulares, o composto activo pode ser preparado com um transportador que protege o composto contra a libertação rápida, tal como, por exemplo, uma formulação com libertação sustentada ou controlada, que inclui implantes, emplastros transdérmicos e sistemas de libertação microencapsulados. Podem ser usados polímeros biocompatíveis biologicamente degradáveis tais como etileno-acetato de vinilo, polianidridos, ácido poliglicólico, colagénio, poliortoésteres e ácido poliláctico. Os métodos para preparar tais formulações são bem conhecidos dos técnicos especializados; ver, por exemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems,* J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

De acordo com concretizações particulares, um anticorpo da invenção pode ser administrado oralmente, por exemplo, num diluente inerte ou num transportador comestível metabolizável. O anticorpo (e ingredientes adicionais, se desejado) também pode ser encerrado numa cápsula de gelatina dura ou mole, prensada em comprimidos ou adicionada directamente a alimentos. Para administração terapêutica oral, os anticorpos podem ser misturados com excipientes e usados na forma de comprimidos orais, comprimidos bucais, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes e similares. Se for pretendido administrar um anticorpo da invenção por uma outra via que não a parentérica, pode ser necessário escolher um revestimento de um material que previna sua inactivação.

A presente invenção também se refere a um método para inibir a actividade de globulómeros da invenção num indivíduo que sofre de uma desordem na qual a proteína - amilóide está envolvida e em que, em particular a actividade dos ditos globulómeros da invenção seja importante. O dito método compreende a administração de pelo menos um anticorpo da invenção ao indivíduo com o objectivo de inibir a actividade do globulómero ao qual o anticorpo se liga. O dito indivíduo é preferivelmente um ser humano. Um anticorpo da invenção pode ser administrado com propósito terapêutico a um indivíduo humano. Em adição, um anticorpo da invenção pode ser administrado a um mamífero não humano com propósitos veterinários ou no contexto de um modelo animal para uma desordem particular. Estes modelos animais podem ser úteis para avaliar a eficácia terapêutica de anticorpos da invenção (por exemplo, para testar dosagens e cursos de tempo de administração).

As desordens em que os globulómeros da invenção desempenham um papel incluem em particular desordens em cujo desenvolvimento e/ou progressão está envolvido um globulómero da invenção. Estas são em particular as desordens nas quais globulómeros da invenção são, evidentemente ou presumidamente, responsáveis pela patofisiologia da dita desordem ou constituem um factor que contribui para o desenvolvimento e/ou progressão da dita desordem. Consequentemente, são aqui incluídas desordens em que a inibição da actividade de globulómeros da invenção pode aliviar sintomas e/ou a progressão da desordem. Estas

desordens podem ser verificadas, por exemplo, por uma maior concentração de globulómeros da invenção num fluido biológico de um indivíduo que sofre de uma desordem particular (por exemplo, maior concentração no soro, plasma, CSF, urina, etc.). Isto pode ser detectado, por exemplo, usando um anticorpo da invenção. Os globulómeros da invenção desempenham um papel importante na patologia associada a uma multiplicidade de desordens nas quais estão envolvidos elementos neurodegenerativos, deficiências cognitivas, elementos neurotóxicos e elementos inflamatórios.

Num outro aspecto da invenção, as desordens que podem ser tratadas ou prevenidas incluem aquelas associadas a amiloidoses. O termo "amiloidoses" denota aqui várias desordens caracterizadas por dobragem anormal, agrupamento, agregação e/ou acúmulo de proteínas particulares (amilóides, proteínas fibrosas e seus precursores) em vários tecidos do corpo. Na doença de Alzheimer e na síndrome de Down é afectado tecido nervoso, e na angiopatia de amilóide cerebral (CAA) são afectados vasos sanguíneos.

As composições farmacêuticas da invenção podem incluir um "quantidade terapeuticamente eficaz" ou uma "quantidade profilacticamente eficaz" de um anticorpo ou uma porção de anticorpo da invenção. Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, nas dosagens e por períodos de tempo necessários, para alcançar o resultado terapêutico desejado. Uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo ou da porção de anticorpo pode ser determinada por um perito na especialidade e pode variar de acordo com factores tais como o estado de doença, a idade, sexo e peso do indivíduo, e a capacidade do anticorpo ou porção de anticorpo para eliciar uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz é também uma em que quaisquer efeitos tóxicos ou detrimentais do anticorpo ou da porção de anticorpo são suplantados pelos efeitos terapeuticamente benéficos. Uma "quantidade profilacticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, nas dosagens e por períodos de tempo necessários, para alcançar o resultado profiláctico desejado. Tipicamente, uma vez que uma dose profiláctica é usada em sujeitos antes de, ou num estádio precoce da

doença, a quantidade profilacticamente eficaz será inferior à quantidade terapeuticamente eficaz.

Além disso, a presente invenção inclui um método adicional para prevenir ou tratar doença de Alzheimer num paciente que necessita de tal prevenção ou tratamento. Este método compreende a etapa de administração da vacina supramencionada ao paciente numa quantidade suficiente para efectuar a prevenção ou o tratamento.

Adicionalmente, a presente invenção engloba um método para identificar compostos adequados para imunização activa de um paciente que se prevê que venha a desenvolver uma amiloidose, por exemplo, doença de Alzheimer. Este método compreende: 1) expor um ou mais compostos de interesse a um ou mais dos anticorpos descritos acima durante um tempo e sob condições suficientes para que o um ou mais compostos que se liguem ao anticorpo ou aos anticorpos; 2) identificar os compostos que se ligam ao anticorpo ou aos anticorpos, os compostos identificados para serem usados em imunização activa num paciente que se prevê que venha a desenvolver uma amiloidose, por exemplo, doença de Alzheimer.

No contexto do uso em diagnóstico dos anticorpos, a determinação qualitativa ou quantitativa de globulómeros específicos serve em particular para diagnosticar formas de -amilóide relevantes para doenças. Neste contexto, especificidade significa a possibilidade de ser capaz de detectar um globulómero particular ou um seu derivado, ou uma sua mistura, com sensibilidade suficiente. Os anticorpos da invenção vantajosamente têm concentrações de limite de detecção inferiores a 10 ng/mL de amostra, preferivelmente inferiores a 1 ng/mL de amostra e de um modo particularmente preferível inferiores a 100 pg/mL de amostra, significando que pelo menos a concentração de globulómero por mL de amostra indicada em cada caso, e vantajosamente também menores concentrações, podem ser detectadas pelos anticorpos da invenção.

A detecção é realizada imunologicamente. Isto pode ser realizado em princípio usando qualquer método de ensaio analítico ou de diagnóstico em que são usados anticorpos, incluindo técnicas de aglutinação e de precipitação, imunoensaios, métodos imuno-histoquímicos e técnicas de

imuno-*blot*, por exemplo, *Western blotting* ou, preferivelmente, métodos de *dot blot*. Métodos *in vivo*, por exemplo, métodos de imagiologia, também são aqui incluídos.

O uso em imunoensaios é vantajoso. Imunoensaios competitivos, isto é, ensaios onde o antigénio e o antigénio marcado (traçador) competem pela ligação ao anticorpo, e imunoensaios em sanduíche, isto é, ensaios onde a ligação de anticorpos específicos ao antigénio é detectada por um segundo anticorpo, geralmente marcado, são ambos adequados. Estes ensaios podem ser homogéneos, isto é, sem separação em fases sólidas e líquidas, ou heterogéneos, isto é, marcadores ligados são separados dos não ligados, por exemplo, por meio de anticorpos ligados a fases sólidas. Dependendo da marcação e do método de medição, os vários formatos de imunoensaio heterogéneos e homogéneos podem ser classificados em classes particulares, por exemplo, RIA (radioimunoensaios), ELISA (ensaio imunossorvente com enzima ligada), FIA (imunoensaio de fluorescência), LIA (imunoensaio de luminescência), TRFIA (FIA resolvido no tempo), IMAC (imunoativação), EMIT (teste imunitário multiplicado por enzima), TIA (imunoensaio turbidimétrico), I-PCR (imuno-PCR).

Para a quantificação de globulómero da invenção, é dada preferência a imunoensaios competitivos em que uma quantidade definida de derivado de globulómero marcado que serve como traçador compete com o globulómero da amostra (contendo uma quantidade desconhecida de globulómeros não marcados) a quantificar pela ligação ao anticorpo usado. A quantidade de antigénio, isto é, a quantidade de globulómero, na amostra pode ser determinada a partir da quantidade do traçador deslocado com a ajuda de uma curva padrão.

Dos marcadores disponíveis para este propósito, as enzimas mostraram-se vantajosas. Sistemas baseados em peroxidases, em particular peroxidase do rábano-silvestre, fosfatase alcalina e -D-galactosidase, podem ser usados, por exemplo. Estão disponíveis para estas enzimas substratos específicos cuja conversão pode ser monitorada fotometricamente, por exemplo. Sistemas de substratos adequados são baseados em fosfato de p-nitrofenilo (p-NPP),

fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo /azul nitro de tetrazólio (BCIP/NPT), Fast-Red/fosfato de naftol-AS-TS para fosfatase alcalina; ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico) (ARTS), o-fenilenodiamina (OPT), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), o-dianisidina, ácido 5-aminossalicílico, ácido 3-dimetilaminobenzóico (DMAB) e 3-metil-2-benzotiazolino-hidrazona (MBTH) para peroxidases; o-nitrofenil- -D-galactósido (o-NPG), p-nitrofenil- -D-galactósido e 4-metilumbelifenil- -D-galactósido (MUG) para -D-galactosidase. Em muitos casos, estes sistemas de substratos estão comercialmente disponíveis numa forma pronta para uso, por exemplo, na forma de comprimidos que também podem conter reagentes adicionais tais como tampões apropriados e similares.

Os traçadores usados podem ser globulómeros marcados. Neste sentido, um globulómero particular pode ser determinado marcando o globulómero que vai ser determinado e usando-o como traçador.

O acoplamento de marcadores a globulómeros para preparar traçadores pode ser realizado de uma maneira conhecida *per se*. Refrem-se, por analogia, os comentários acima sobre a derivatização de globulómeros da invenção. Em adição, estão disponíveis vários marcadores apropriadamente modificados para conjugação com proteínas, por exemplo, enzimas conjugadas com biotina, avidina, extravidina ou estreptavidina, enzimas activadas por maleimida e similares. Estes marcadores podem reagir directamente com o oligómero ou, se exigido, com o globulómero apropriadamente derivatizado, para originar o traçador. Se, por exemplo, é usado um conjugado de estreptavidina-peroxidase, então este requer primeiramente a biotinilação do globulómero. Isto aplica-se correspondentemente à ordem inversa. Métodos adequados para esta finalidade também são conhecidos dos técnicos especializados.

Se for escolhido um formato de imunoensaio heterogéneo, o complexo antigénio-anticorpo pode ser separado ligando-o ao suporte, por exemplo, por meio de um anticorpo anti-idiotípico acoplado ao dito suporte, por exemplo, um anticorpo dirigido contra IgG de coelho. Suportes apropriados, em particular placas de microtitulação

revestidas com anticorpos apropriados, são conhecidos e de forma parcial comercialmente disponíveis.

A presente invenção refere-se adicionalmente a estojos (*kit*) de imunoensaio tendo pelo menos um anticorpo como descrito acima e componentes adicionais. Os ditos estojos são, geralmente, na forma de uma unidade de embalagem, uma combinação de meios para realizar uma determinação de globulómeros da invenção. Com o propósito de facilitar o máximo possível o manuseio, os ditos meios são preferivelmente proporcionados numa forma essencialmente pronta para o uso. Uma disposição vantajosa oferece o imunoensaio na forma de um estojo. Um estojo geralmente compreende múltiplos recipientes para disposição separada de componentes. Todos os componentes podem ser proporcionados numa diluição pronta para o uso, na forma de um concentrado para diluição ou de uma substância seca ou um liofilizato para dissolução ou suspensão; componentes individuais ou todos, podem ser congelados ou armazenados à temperatura ambiente até ao uso. Os soros são preferivelmente congelados por choque de temperatura, por exemplo, a -20°C, de maneira que nesses casos um imunoensaio tem que ser mantido preferivelmente a temperaturas abaixo da congelação antes do uso.

Componentes adicionais fornecidos com o imunoensaio dependem do tipo do dito imunoensaio. Geralmente, proteína padrão, traçador, que pode ou não ser necessário, e soro de controlo, são fornecidos juntamente com o anti-soro. Além disso, também podem ser incluídos placas de microtítulo, preferivelmente revestidas com anticorpo, tampões, por exemplo, para testar, para lavar ou para conversão do substrato, e o próprio substrato da enzima.

Princípios gerais de imunoensaios e da geração e uso de anticorpos como auxiliares em laboratório e hospital podem ser encontrados, por exemplo, em Antibodies, A Laboratory Manual (Harlow, E., e Pista, D., Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988).

Assim, a presente invenção também inclui um método para diagnosticar uma amiloidose, por exemplo, doença de Alzheimer, num paciente suspeito de ter esta doença. Este método compreende as etapas de: 1) isolar uma amostra

biológica do paciente; 2) colocar a amostra biológica em contacto com pelo menos um dos anticorpos descritos acima por um tempo e em condições suficientes para formação de complexos antigénio/anticorpo; e 3) detectar a presença dos complexos antigénio/anticorpo na dita amostra, em que a presença dos complexos indica um diagnóstico de uma amiloidose, por exemplo, doença de Alzheimer, no paciente. O antigénio pode ser, por exemplo, um globulómero ou uma sua porção ou um seu fragmento que tenha as mesmas propriedades funcionais que o globulómero completo (por exemplo, actividade de ligação).

Adicionalmente, a presente invenção inclui um outro método para diagnosticar uma amiloidose, por exemplo, doença de Alzheimer num paciente suspeito de ter esta doença. Este método compreendendo as etapas de: 1) isolar uma amostra biológica do paciente; 2) colocar a amostra biológica em contacto com um antigénio por um tempo e em condições suficientes para a formação de complexos anticorpo/antigénio; 3) adicionar um conjugado aos complexos anticorpo/antigénio resultantes por um tempo e em condições suficiente para permitir que o conjugado se ligue ao anticorpo ligado, em que o conjugado compreende um dos anticorpos descritos acima, ligado a um composto gerador de um sinal capaz de gerar um sinal detectável; e 4) detectar a presença de um anticorpo que possa estar presente na amostra biológica, através da detecção de um sinal gerado pelo composto geradoe de sinal, o sinal indicando um diagnóstico de uma amiloidose, por exemplo, doença de Alzheimer no paciente. O antigénio pode ser um globulómero ou uma sua porção ou um seu fragmento tendo as mesmas propriedades funcionais que o globulómero completo (por exemplo, actividade de ligação).

A presente invenção inclui um método adicional para diagnosticar uma amiloidose, por exemplo, doença de Alzheimer, num paciente suspeito de ter uma amiloidose, por exemplo, doença de Alzheimer. Este método compreende as etapas de: 1) isolar uma amostra biológica do dito paciente; 2) colocar a amostra biológica em contacto com anti-anticorpo, em que o anti-anticorpo é específico para um dos anticorpos descritos acima, por um tempo e em condições suficientes para permitir a formação de complexos anti-

anticorpo/anticorpo, os complexos contendo anticorpo presentes na amostra biológica; 2) adicionar um conjugado aos complexos anti-anticorpo/anticorpo resultantes por um tempo e em condições suficientes para permitir que o conjugado se ligue ao anticorpo ligado, em que o conjugado compreende um antigénio, que se liga a um composto gerador de sinal capaz de gerar um sinal detectável; e 3) detectar um sinal gerado pelo composto gerador de sinal, o sinal indicando um diagnóstico de uma amiloidose, por exemplo, doença de Alzheimer, no paciente.

Também, a presente invenção inclui um estojo compreendendo: a) pelo menos um dos anticorpos descritos acima e b) um conjugado compreendendo um anticorpo ligado a um composto gerador de sinal, em que o anticorpo do conjugado é diferente do anticorpo isolado.

A presente invenção também engloba um estojo compreendendo: a) um anti-anticorpo contra um dos anticorpos descritos acima e b) um conjugado compreendendo um antigénio ligado a um composto gerador de sinal. O antigénio pode ser um globulómero ou um seu fragmento ou uma sua porção tendo as mesmas características funcionais que o globulómero (por exemplo, actividade de ligação).

Numa concretização de diagnóstico da presente invenção, um anticorpo da presente invenção, ou uma sua porção, revestem uma fase sólida (ou estão presentes numa fase líquida). A amostra teste ou biológica (por exemplo, sangue completo, fluido cerebrospinal, soro, etc.) é em seguida colocada em contacto com a fase sólida. Se o antigénio (por exemplo, globulómero) estiver presente na amostra, este antigénio liga-se aos anticorpos na fase sólida e é em seguida detectado por um método directo ou indirecto. O método directo compreende simplesmente detectar a presença do complexo por si próprio e assim a presença do antigénio. No método indirecto, é adicionado um conjugado ao antigénio ligado. O conjugado compreende um segundo anticorpo, que se liga ao antigénio ligado, ligado a um composto gerador de sinal ou marcador. Caso o segundo anticorpo se ligue ao antigénio ligado, o composto gerador de sinal gera um sinal mensurável. Tal sinal indica então a presença do antigénio na amostra de teste.

Exemplos de fases sólidas usadas em imunoensaios de diagnóstico são materiais porosos e não porosos, partículas de látex, partículas magnéticas, micropartículas (ver a Patente U.S. 5.705.330), contas, membranas, poços de microtítulo e tubos de plástico. A escolha do material da fase sólida e do método de marcação do antigénio ou do anticorpo presentes no conjugado, se desejado, são determinados com base nas características de desempenho do formato de ensaio desejado.

Da maneira supramencionada, o conjugado (ou reagente indicador) compreenderá um anticorpo (ou possivelmente um anti-anticorpo, dependendo do ensaio), ligado a um composto gerador de sinal ou marcador. Este composto gerador de sinal ou "marcador" é por si próprio detectável ou pode reagir com um ou mais compostos adicionais para gerar um produto detectável. Exemplos de compostos geradores de sinal incluem cromogénios, radioisótopos (por exemplo, ^{125}I, ^{131}I, ^{32}P, ^{3}H, ^{35}S e ^{14}C), compostos quimioluminescentes (por exemplo, acridínio), partículas (visíveis ou fluorescentes), ácidos nucleicos, agentes complexantes ou catalisadores tais como enzimas (por exemplo, fosfatase alcalina, fosfatase ácida, peroxidase de rábano-silvestre, beta-galactosidase e ribonuclease). No caso do uso de enzimas (por exemplo, fosfatase alcalina ou peroxidase de rábano-silvestre), a adição de um substrato cromogénico, fuorogénico ou luminogénico resulta na geração de um sinal detectável. Também são úteis outros sistemas de detecção tais como fluorescência resolvida no tempo, fluorescência de reflexão interna, amplificação (por exemplo, reacção em cadeia pela polimerase) e espectroscopia Raman.

Exemplos de fluidos biológicos que podem ser testados pelos imunoensaios anteriores incluem plasma, sangue completo, sangue completo seco, soro, fluido cerebrospinal ou extractos aquosos ou organo-aquosos de tecidos e células.

A presente invenção também engloba um método para detectar a presença de anticorpos numa amostra de teste. Este método compreende as etapas de: (A) colocar a amostra de teste suspeita de conter anticorpos em contacto com anti-anticorpo específico para os anticorpos na amostra do

paciente durante um tempo e sob condições suficientes para permitir a formação de complexos anti-anticorpo/anticorpo, em que o anti-anticorpo é um anticorpo da presente invenção que se liga a um anticorpo na amostra do paciente; (b) adicionar um conjugado aos complexos anti-anticorpo/anticorpo resultantes, o conjugado compreendendo um antigénio (que se liga ao anti-anticorpo) ligado a um composto gerador de sinal capaz de detectar um sinal detectável; e (d) detectar a presença dos anticorpos que possam estar presentes na amostra de teste por detecção do sinal gerado pelo composto gerador de sinal. Pode-se usar um controlo ou calibrador que compreende anticorpo para o anti-anticorpo.

Estojos também são incluídos no escopo da presente invenção. Mais especificamente, a presente invenção inclui estojos para determinar a presença de antigénios (por exemplo, globulómeros) num paciente suspeito de ter doença de Alzheimer ou uma outra condição caracterizada por deficiência cognitiva. Em particular, um estojo para determinar a presença de antigénios numa amostra de teste compreende a) um anticorpo como aqui definido ou uma sua porção; e b) um conjugado compreendendo um segundo anticorpo (tendo especificidade para o antigénio) ligado a um composto gerador de sinal capaz de gerar um sinal detectável. O estojo também pode conter um controlo ou calibrador que compreende um reagente que se liga ao antigénio.

A presente invenção também inclui um estojo para detectar anticorpos numa amostra de teste. O estojo pode compreender a) um anti-anticorpo específico (por exemplo, um da presente invenção) para o anticorpo de interesse, e b) um antigénio ou uma sua porção como definido acima. Um controlo ou calibrador compreendendo um reagente que se liga ao antigénio também pode ser incluído. Mais especificamente, o estojo pode compreender a) um anti-anticorpo (tal como o da presente invenção) específico para o anticorpo e b) um conjugado compreendendo um antigénio (por exemplo, globulómero) ligado a um composto gerador de sinal capaz de gerar um sinal detectável. Novamente, o estojo também pode compreender um controlo ou calibrador compreendendo um reagente que se liga ao antigénio.

O estojo também pode compreender um recipiente tal como um frasco, garrafas ou tiras, com cada recipiente com uma fase sólida pré estabelecida, e outros recipientes contendo os respectivos conjugados. Estes estojos podem também conter frascos ou recipientes de outros reagentes necessários para realizar o ensaio, tais como reagentes de lavagem, processamento e indicadores.

Deve-se notar também que a presente invenção não somente inclui os anticorpos de comprimento total descritos acima, mas também suas porções ou seus fragmentos, por exemplo, a sua porção Fab. Adicionalmente, a presente invenção engloba qualquer anticorpo tendo as mesmas propriedades que os presentes anticorpos, por exemplo, em termos de especificidade de ligação, estrutura, etc.

Vantagens da invenção:

Podem-se obter, por imunização com globulómero A (20-42), diferentes anticorpos monoclonais que diferem na sua tolerância ou reconhecimento de diferentes oligómeros A (1-42) e oligómeros A (X-42), como determinado por *dot blotting* comparativo como descrito acima. Isto permite o desenvolvimento de um anticorpo dirigido para oligómeros A truncados no terminal N que possuem uma relação óptima entre efeito de melhoramento da cognição, especificidade desejada em relação a outras formas de A , e perfil mínimo de efeitos secundários. De modo surpreendente, os globulómeros A (1-42) e A (12-42), a despeito de conterem o elemento estrutural, são apenas parcialmente reconhecidos por anticorpos obtidos usando o globulómero adicionalmente truncado A (20-42) como antigénio.

Por restrição da forma de A oligomérica específica para o princípio estrutural básico (isto é, uso dos globulómeros A N-terminalmente truncados) é gerado um perfil de anticorpos em imunização activa que é altamente específico para formas de A oligoméricas. O mesmo é verdade para anticorpos monoclonais para uso em imunização passiva. A vantagem de uma tal estratégia específica para imunização (activa e passiva) é que não induzirá uma resposta imunitária contra monómeros A , péptidos A em estados fibrilares de agregação ou sAPP . Isto é vantajoso de diversas maneiras:

1) Na forma de placas de A insolúveis, os péptidos A em estados fibrilares de agregação constituem a maior parte de todo o conjunto de péptidos A nos cérebros com DA. Uma libertação massiva de A por dissolução de placas de A induzida por reacção de anticorpos anti-A com estas placas deve ser considerada como detrimental. Esta libertação massiva de A atravessaria então a barreira hematoencefálica, entraria na corrente sanguínea e potencialmente aumentaria o risco de micro-hemorragias. Além disso, no ensaio da ELAN esta mesma estratégia de imunização com formas de péptidos A fibrilares exigiu o cancelamento do ensaio devido a 6% de casos com um início de meningoencefalite.

2) Respostas imunitárias dirigidas contra formas monoméricas de péptidos A são indesejáveis, já que foi possível mostrar que estas últimas podem exercer efeitos melhoradores da cognição.

3) Respostas imunitárias dirigidas contra sAPP são da mesma forma indesejáveis, pois podem levar a uma reacção com a proteína precursora APP que ocorre fisiologicamente e desse modo a uma reacção auto-imune. Além disso, a sAPP mostrou também exercer efeitos melhoradores da cognição.

4) Uma resposta dirigida contra péptido A vascular na forma de CAA deve ser evitada a fim de evitar o efeito secundário indesejável de micro-hemorragias (anticorpos contra a porção central de A e que além disso não se ligam a péptidos A agregados na forma de CAA, induzem menos micro-hemorragias em comparação com os dirigidos contra o terminal N, ver acima).

5) Anticorpos que reagem especificamente com oligómeros A terão maior biodisponibilidade relativamente a espécies de A patofisiologicamente relevantes, pois não serão ligadas, por exemplo, a A fibrilar e assim tornadas indisponíveis para efeito terapêutico.

Informação sobre depósitos: O hibridoma que produz anticorpo monoclonal 5F7 foi depositado na American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110 em 01 de Dezembro, 2005 nos termos do tratado de Budapeste e recebeu a designação PTA-7241.

Adicionalmente, o hibridoma que produz anticorpo monoclonal 10F11 foi depositado na American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801 em 01 de Dezembro, 2005 nos termos do Tratado de Budapeste e recebeu a designação PTA-7239. Adicionalmente, o hibridoma que produz anticorpo monoclonal 4B7 foi depositado na American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801 em 01 de Dezembro de 2005 nos termos do Tratado de Budapeste e recebeu a designação PTA-7242, e o hibridoma que produz anticorpo monoclonal 7C6 foi depositado na American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801 em 01 de Dezembro de 2005 nos termos do Tratado de Budapeste e recebeu a designação PTA-7240. Adicionalmente, o hibridoma que produz anticorpo monoclonal 6A2 foi depositado na American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801 em 28 de Fevereiro de 2006 nos termos do Tratado de Budapeste e recebeu a designação PTA-7409, e o hibridoma que produz anticorpo monoclonal 2F2 foi depositado na American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801 em 28 de Fevereiro de 2006 nos termos do Tratado de Budapeste e recebeu a designação PTA-7408. O hibridoma que produz anticorpo monoclonal 4D10 foi depositado na American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801 em 28 de Fevereiro de 2006 nos termos do Tratado de Budapeste e recebeu a designação PTA-7405. O hibridoma que produz anticorpo monoclonal 7E5 foi depositado na American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801 em 16 de Agosto de 2006 nos termos do Tratado de Budapeste e recebeu a designação PTA-7809. O hibridoma que produz anticorpo monoclonal 10C1 foi depositado na American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801 em 16 de Agosto de 2006 nos termos do Tratado de Budapeste e recebeu designação PTA-7810. O hibridoma que produz anticorpo monoclonal 3B10 foi depositado na American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 10801 em 01 de Setembro de 2006 nos termos do Tratado de Budapeste e recebeu a designação PTA-7851. Todos os

depósitos foram feitos a favor de Abbott Laboratories, 100 Abbott Park Road, Abbott Park, Illinois 60064 (US).

Nos desenhos:

Figura 1 mostra cromatogramas de exclusão por tamanho de A (1-42) e A (1-40). Monómero A (1-42) foi dissolvido em A) NH_4OH a 0,1%, B) ácido fórmico a 70% C) NaOH a 0,1% e em D) A (1-40) foi dissolvido em NaOH a 0,1%. Subsequentemente, as amostras foram adicionalmente diluídas 1:10 em NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4. Estas amostras foram incubadas durante 5 minutos (coluna da esquerda) ou 1 hora (coluna da direita) após dissolução à temperatura ambiente, em seguida aplicadas à coluna de exclusão por tamanho;

Figura 2 A) apresenta um SDS-PAGE de proteínas-padrão (proteínas marcadoras moleculares, pista 1); preparação de fibrilhas de A (1-42); controlo (pista 2); preparação de fibrilhas de A (1-42) + mAb 5F7, 20 horas, 37°C, sobrenadante (pista 3); preparação de fibrilhas de A (1-42) + mAb 5F7, 20 horas, 37°C, pelete (pista 4); preparação de fibrilhas de A (1-42) + mAb 6E10, 20 horas, 37°C, sobrenadante (pista 5); preparação de fibrilhas de A (1-42) + mAb 6E10, 20 horas, 37°C, pelete (pista 6););

B) apresenta os resultados da análise quantitativa de mAb ligados a fibrilhas de A em percentagem do anticorpo total;

Figura 3 é um diagrama de barras que apresenta os resultados do teste de reconhecimento de objetos com ratinhos transgénicos APP/L após imunização activa com monómeros A (1-42) em NH_4OH a 0,1%, globulómeros A (1-42) e globulómeros A (20-42) comparativamente com ratinhos de tipo selvagem (controlo positivo) e ratinhos APP/L tratados com PBS (controlo negativo), onde círculos indicam diferenças significativas de ratinhos APP/L tratados com PBS e asteriscos indicam

diferenças altamente significativas do nível de probabilidade (50%) de acordo com o teste t *post-hoc* depois de $P<0,05$ em ANOVA para diferenças entre grupos;

Figura 4 mostra *dot blots* da reatividade de 100 pmol/µL (linha A); 10 pmol/µL (linha B); 1 pmol/µL (linha C); 0,1 pmol/µL (linha D) e 0,01 pmol/µL (linha E) de globulómero A (1-42) (coluna 1); de monómero A (1-42) pré-tratado com HFIP em Pluronic F68 (coluna 2); de globulómero A (20-42) (coluna 3); de globulómero A (12-42) (coluna 4); de monómero A (1-40) pré-tratado com HFIP em DMSO (coluna 5); de monómero A (1-42), NH_4OH (coluna 6); de uma preparação de fibrilhas de A (1-42) (coluna 7); e de sAPP da Sigma (coluna 8) com vários anti-soros obtidos após uma imunização activa de ratinhos Tg APP/L com globulómero A (20-42);

Figura 5 é um diagrama de barras que mostra as concentrações de péptido A (1-42) e A (1-40) solúvel e insolúvel em extractos de cérebro de ratinhos Tg APP/PS1 activamente imunizados com monómero A (1-42) (NOH a 0,1%), globulómero A (1-42), globulómero A (20-42) ou veículo como controlo;

Figura 6 é um diagrama de barras que mostra os resultados do teste de reconhecimento de objetos com ratinhos transgénicos APP/L após imunização passiva com os anticorpos anti-globulómero A (20-42), 5F7, 10F11 e 7C6, comparativamente com ratinhos de controlo para A) cada anticorpo separadamente e B) para todos os anticorpos tomados conjuntamente;

Figura 7 A) apresenta uma análise *dot blot* da especificidade de diferentes anticorpos anti-A (-6E10, -5F7, -4B7, -10F11, -6A2, -4D10, -3B10, -2F2, -7C6, -7E5, -10C1). Os anticorpos monoclonais testados aqui foram obtidos por imunização activa de ratinhos com globulómero A (20-42) seguida por seleção das células de

hibridoma fundidas (excepto para o 6E10 comercial disponível, Signet N.º 9320). As formas de A individuais foram aplicadas em diluições em série e incubadas com os anticorpos monoclonais respectivos para reação imune:

1. Monómero A (1-42), NaOH a 0,1%
2. Monómero A (1-40), NaOH a 0,1%
3. Monómero A (1-42), NaOH a 0,1%
4. Monómero A (1-40), NaOH a 0,1%
5. Globulómero A (1-42)
6. Globulómero A (12-42)
7. Globulómero A (20-42)
8. Preparação de fibrilhas de A (1-42)
9. sAPP (Sigma) (primeiro ponto: 1 pmol)

B) A avaliação quantitativa foi feita usando uma análise densitométrica da intensidade. Para cada forma de A , apenas o ponto correspondente à concentração mais baixa de antigénio foi avaliado desde que tivesse uma densidade relativa superior a 20% da densidade relativa do último ponto identificado opticamente de forma inequívoca do globulómero A (20-42) (patamar). Este valor de patamar foi determinado independentemente para cada *dot-blot*. O valor indica a relação entre reconhecimento de globulómero A (20-42) e a forma de A respectiva para esse anticorpo;

Figura 8 mostra a ligação de anticorpos em concentrações diferentes a secções transversais dos noecórtices de pacientes com doença de Alzheimer (DA) ou ratinhos transgénicos APP idosos:

A) Verificação de depósitos de amilóide por coloração com vermelho do Congo na forma de placas no tecido cerebral e na forma de angiopatia de amilóide cerebral (CAA) em vasos cerebrais na linha Tg2576 de ratinhos transgénicos APP e num paciente de DA (RZ55);

B) A coloração forte de depósitos parenquimatosos de A (placas de amilóide) num paciente de DA (RZ16) ocorre apenas com 6G1 e com o anticorpo 6E10 comercialmente disponível (coluna da esquerda) ao passo que os anticorpos 5F7, 2F2 e 6A2 (segunda coluna), 4D10, 10F11 e 3B10 (terceira coluna) e 7C6, 7E5 e 10C1 (coluna da direita) não exibem coloração. Todos os anticorpos foram usados numa concentração de 0,7 µg/mL;

C) A coloração forte de depósitos parenquimatosos de A (placas de amilóide) em Tg2576 de 19 meses de idade ocorre apenas com 6G1 e com o anticorpo 6E10 comercialmente disponíveis (coluna da esquerda) ao passo que os anticorpos 5F7, 2F2 e 6A2 (segunda coluna), 4D10, 10F11 e 3B10 (terceira coluna) e 7C6, 7E5 e 10C1 (coluna da direita) não exibem coloração. Todos os anticorpos foram usados numa concentração de 0,7 µg/mL;

D)-G) Quantificação da análise de coloração da placa de A nas imagens histológicas usando análise de imagem. Os valores de densidade óptica (0% = ausência de coloração) foram calculados a partir dos valores da escala de cinzentos de placas subtraídos dos valores da escala de cinzentos do tecido de fundo: D) Coloração a 0,7 µg/mL de anticorpo em ratinhos Tg2576 idosos, E) coloração a 3 concentrações diferentes de anticorpos em ratinhos APP/L, F) coloração a 0,7 µg/mL de anticorpo num paciente de DA (RZ55), e G) coloração a 3 concentrações diferentes de anticorpos num paciente de DA (RZ16). As diferenças entre a coloração dos anticorpos comercialmente disponíveis 6E10 (asteriscos) e 4G8 (círculos) e todos os outros anticorpos (três asteriscos/círculos: $p<0,001$ *versus* controlo; teste t *post-hoc* de Bonferroni depois de ANOVA com $p<0,001$) foram estatisticamente avaliados (D,F). Em E) e G) todos os anticorpos excepto 6G1 apresentaram

sempre coloração significativamente menor do que os anticorpos comercialmente disponíveis 6E10 e 4G8 ($p<0,001$ em teste t *post-hoc* depois de $p<0,001$ em ANOVA).

H) A coloração forte de depósitos vasculares de A (setas) ocorre apenas com 6G1 e com o anticorpo 6E10 comercialmente disponível (coluna da esquerda) ao passo que os anticorpos 5F7, 2F2 e 6A2 (segunda coluna), 4D10, 10F11 e 3B10 (terceira coluna) e 7C6, 7E5 e 10C1 (coluna da direita) não exibem coloração. Todos os anticorpos foram usados numa concentração de 0,7 µg/mL. Uma situação qualitativamente similar foi encontrada em ratinhos Tg2576 (não mostrado aqui);

Figura 9 Título de anticorpo anti-A e perfil de selectividade em *dot-blot* em plasma de ratinhos TG2576 aproximadamente um ano após imunização activa. Amostras de plasma de ratinhos Tg2576 aproximadamente um ano após a última imunização com A) globulómero A (20-42), B) globulómero A (12-42), C) monómero A (1-42) e D) veículo, foram avaliados quanto a anticorpos anti-A produzidos e ainda presentes, por *dot-blot*.

1. globulómero A (1-42)

2. monómero A (1-42), pré-tratado com HFIP, em Pluronic F68 a 0,1%

3. globulómero A (20-42)

4. globulómero A (12-42)

5. monómero A (1-40), pré-tratado com HFIP, DMSO 5 mM

6. monómero A (1-42), NH$_4$OH a 0,1%

7. preparação de fibrilhas de A (1-42)

8. sAPP (Sigma); (primeiro ponto: 1 pmol);

Figura 10 mostra uma tabela que resume os níveis de globulómero A (20-42) no tecido cerebral de seres humanos tendo doença de Alzheimer e de um controlo não demente;

Figura 11 ilustra as sequências de nucleótidos e de aminoácidos das cadeias variáveis pesada e leve de anticorpos monoclonais (mAb) da maneira adiante (regiões determinantes de complementaridade (CDR) estão sublinhadas em cada sequência de aminoácidos):

Fig. 11	SEQ ID NO:	Tipo de Sequência	Cadeia	mAb
A1	1	nucleótido	pesada variável (VH)	5F7
A2	2	nucleótido	leve variável (VL)	5F7
Al	3	aminoácido	pesada variável (VH)	5F7
A2	4	aminoácido	leve variável (VL)	5F7
B1	5	nucleótido	pesada variável (VH)	10F11
B2	6	nucleótido	leve variável (VL)	10F11
B1	7	aminoácido	pesada variável (VH)	10F11
B2	8	aminoácido	leve variável (VL)	10F11
C1	9	nucleótido	pesada variável (VH)	7C6
C2	10	nucleótido	leve variável (VL)	7C6
C1	11	aminoácido	pesada variável (VH)	7C6
C2	12	aminoácido	leve variável (VL)	7C6
D1	13	nucleótido	pesada variável (VH)	4B7
D2	14	nucleótido	leve variável (VL)	4B7
D1	15	aminoácido	pesada variável (VH)	4B7
D2	16	aminoácido	leve variável (VL)	4B7
E1	17	nucleótido	pesada variável (VH)	2F2
E2	18	nucleótido	leve variável (VL)	2F2
E1	19	aminoácido	pesada variável (VH)	2F2

E2	20	aminoácido	leve variável (VL)	2F2
F1	21	nucleótido	pesada variável (VH)	6A2
F2	22	nucleótido	leve variável (VL)	6A2
F1	23	aminoácido	pesada variável (VH)	6A2
F2	24	aminoácido	leve variável (VL)	6A2
G1	25	nucleótido	pesada variável (VH)	4D10
G2	26	nucleótido	leve variável (VL)	4D10
G1	27	aminoácido	pesada variável (VH)	4D10
G2	28	aminoácido	leve variável (VL)	4D10
H1	29	nucleótido	pesada variável (VH)	7E5
H2	30	nucleótido	leve variável (VL)	7E5
H1	31	aminoácido	pesada variável (VH)	7E5
H2	32	aminoácido	leve variável (VL)	7E5
I1	33	nucleótido	pesada variável (VH)	10C1
I2	34	nucleótido	leve variável (VL)	10C1
I1	35	aminoácido	pesada variável (VH)	10C1
I2	36	aminoácido	leve variável (VL)	10C1
J1	37	nucleótido	pesada variável (VH)	3B10
J1	38	aminoácido	pesada variável (VH)	3B10

Os exemplos seguintes destinam-se a ilustrar a invenção, sem limitar seu escopo.

Exemplo 1: Preparação de globulómeros

A) Globulómero A (1-42)

O péptido A (1-42) sintético (H-1368, Bachem, Bubendorf, Suíça) foi suspenso em 100% de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) a 6 mg/mL e incubado para solubilização completa sob agitação a 37°C durante 1,5 horas. O HFIP actua como um quebrador das ligações de hidrogénio e é usado para eliminar faltas de homogeneidade

estruturais preexistentes no péptido A . O HFIP foi removido por evaporação num SpeedVac e o A (1-42) foi ressuspenso numa concentração de 5 mM em dimetilsulfóxido e tratado com ultra-sons durante 20 segundos. O A (1-42) pré-tratado com HFIP foi diluído com solução salina tamponada com fosfato (PBS) (NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4) para 400 µM e foi adicionado 1/10 do volume de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 2% (em H_2O) (concentração final de 0,2% de SDS). Uma incubação durante 6 horas a 37°C resultou no globulómero A (1-42) de 16/20 kDa (forma curta para oligómero globular intermediário. O globulómero A (1-42) de 38/48 kDa foi gerado por diluição adicional com três volumes de H_2O e incubação durante 18 horas a 37°C. Após centrifugação a 3000 g durante 20 minutos a amostra foi concentrada por ultrafiltração (limite de exclusão de 30 kDa), dialisada contra NaH_2PO_4 5 mM, NaCl 35 mM, pH 7,4, centrifugada a 10 000 g durante 10 minutos e o sobrenadante compreendendo o globulómero A (1-42) de 38/48-kDa foi removido. Em alternativa à diálise o globulómero A (1-42) de 38/48 kDa também pode ser precipitado com um excesso de nove vezes (v/v) de solução de metanol/ácido acético arrefecida em gelo (33% de metanol, 4% de ácido acético) durante 1 hora a 4°C. O globulómero A (1-42) de 38/48 kDa é em seguida precipitado numa pelete (10 minutos a 16 200 g), ressuspenso em NaH_2PO_4 5 mM, NaCl 35 mM, pH 7,4, e o pH é ajustado a 7,4.

b) Globulómero A (1-42) reticulado

O péptido A (1-42) sintético (H-1368, Bachem, Bubendorf, Suíça) foi suspenso em 100% de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) a 6 mg/mL e incubado para solubilização completa sob agitação a 37°C durante 1,5 horas. O HFIP actua como um quebrador das ligações de hidrogénio e foi usado para eliminar faltas de homogeneidade estruturais preexistentes no péptido A . O HFIP foi removido por evaporação num SpeedVac e o A (1-42) foi ressuspenso numa concentração de 5 mM em dimetilsulfóxido e tratado com ultra-sons durante 20 segundos. O A (1-42) pré-tratado com HFIP foi diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS) (NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4) para 400 µM e foi adicionado 1/10 do volume de dodecilsulfato de sódio a 2% (SDS) (em H_2O) (concentração final de 0,2% de SDS). Uma incubação durante 6 horas a 37°C resultou no globulómero

A (1-42) de 16/20 kDa (forma curta para oligómero globular) intermediário. O globulómero A (1-42) de 38/48 kDa foi gerado por diluição adicional com três volumes de H_2O e incubação durante 18 horas a 37°C. A reticulação do globulómero A (1-42) de 38/48 kDa foi agora realizada por incubação com glutaraldeído 1 mM durante 2 horas à temperatura ambiente de 21°C (TA) seguida por tratamento com etanolamina (5 mM) durante 30 minutos à TA.

c) Globulómero A (20-42)

Misturaram-se 1,59 mL de preparação de globulómero A (1-42) preparada de acordo com o exemplo 1a com 38 mL de tampão (MES/NaOH 50 mM, pH 7,4) e 200 µL de uma solução de termolisina a 1 mg/mL (Roche) em água. A mistura reaccional foi agitada à TA durante 20 horas. Em seguida foram adicionados 80 µL de uma solução de EDTA 100 mM, pH 7,4, em água e a mistura foi além disso ajustada a um teor de SDS de 0,01% com 400 µL de uma solução de SDS de intensidade de 1%. A mistura reaccional foi concentrada para aproximadamente 1 mL por meio de um tubo Centriprep para 30 kDa de 15 mL. O concentrado foi misturado com 9 mL de tampão (MES/NaOH 50 mM, SDS a 0,02%, pH 7,4) e novamente concentrado para 1 mL. O concentrado foi dialisado a 6ºC contra 1 l de tampão (fosfato de sódio 5 mM, NaCl 35 mM) num tubo de diálise durante 16 horas. O dialisato foi ajustado para um teor de SDS de 0,1% com uma solução de SDS de intensidade de 2% em água. A amostra foi centrifugada a 10 000 g durante 10 minutos e o sobrenadante de globulómero A (20-42) foi removido.

d) Globulómero A (12-42)

Misturaram-se 2 mL de uma preparação de globulómero A (1-42) preparada de acordo com o exemplo 1a com 38 mL de tampão (fosfato de sódio 5 mM, cloreto de sódio 35 mM, pH 7,4) e 150 µL de uma endoproteinase GluC a 1 mg/mL (Roche) em água. A mistura reaccional foi agitada durante 6 horas à TA, e foram subsequentemente adicionados mais 150 µL de uma endoproteinase GluC a 1 mg/mL (Roche) em água. A mistura reaccional foi agitada à TA por mais 16 horas, seguindo-se a adição de 8 µL de uma solução de DIFP 5 M. A mistura reaccional foi concentrada para aproximadamente 1 mL por meio de um tubo Centriprep para

30 kDa de 15 mL. O concentrado foi misturado com 9 mL de tampão (fosfato de sódio 5 mM, cloreto de sódio 35 mM, pH 7,4) e novamente concentrado para 1 mL. O concentrado foi dialisado a 6ºC contra 1 l de tampão (fosfato de sódio 5 mM, NaCl 35 mM) num tubo de diálise durante 16 horas. O dialisato foi ajustado a um teor de SDS de 0,1% com uma solução de SDS de intensidade de 1% em água. A amostra foi centrifugada a 10 000 g durante 10 minutos e o sobrenadante de globulómero A (12-42) foi removido.

Exemplo 2: Cromatografia de exclusão por tamanho de diferentes preparações de monómero A (1-42) e monómero A (1-40)

A (1-42), NH_4OH a 0,1%:

1 mg de A (1-42) (Bachem, n.º de catálogo H-1368) foi dissolvido em 500 µL de NH_4OH a 0,1% em H_2O e agitou-se durante 1 minuto à temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada durante 5 minutos a 10 000 g. O sobrenadante foi recolhido. A concentração de A (1-42) no sobrenadante foi determinada de acordo com o método de Bradford (BIO-RAD).

amostra de 5 minutos:

20 µL de A (1-42) no sobrenadante contendo NH_4OH a 0,1% foram diluídos com NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, até uma concentração de A (1-42) de 0,2 mg/mL. A amostra foi incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida 100 µL foram analisados por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC).

amostra de 1 hora:

20 µL de A (1-42) no sobrenadante contendo NH_4OH a 0,1% foram diluídos com NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, até uma concentração de A (1-42) de 0,2 mg/mL. A amostra foi incubada durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida 100 µL foram analisados por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC).

A (1-42), HCOOH a 70%:

1 mg de A (1-42) foi dissolvido em 50 µL de HCOOH a 70% em H_2O e agitou-se 1 minuto à temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada durante 5 minutos a 10 000 g. O sobrenadante foi recolhido. A concentração de A (1-42) no sobrenadante é determinada de acordo com o método de Bradford (BIO-RAD).

amostra de 5 minutos:

2 µL de A (1-42) em HCOOH a 70% foram diluídos até uma concentração de 0,2 mg/mL de A (1-42) com NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 e ajustados a pH 7,4 com NaOH 1 M. A amostra foi incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida 100 µL foram analisados por cromatografia de exclusão por tamanho.

amostra de 1 hora:

2 µL de A (1-42) em HCOOH a 70% foram diluídos até uma concentração de 0,2 mg/mL de A (1-42) com NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 e ajustados a pH 7,4 com NaOH 1 M. A amostra foi incubada durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida 100 µL foram analisados por cromatografia de exclusão por tamanho.

A (1-42), NaOH a 0,1% :

1 mg de A (1-42) (Sachem, n.º de catálogo H-1368) foi dissolvido em 500 µL de NaOH a 0,1% em H_2O e agitou-se 1 minuto à temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada durante 5 minutos a 10 000 g. O sobrenadante foi recolhido. A concentração de A (1-42) no sobrenadante é determinada de acordo com o método de Bradford (BIO-RAD).

amostra de 5 minutos:

20 µL de A (1-42) em NaOH a 0,1% foram diluídos até uma concentração de 0,2 mg/mL de A (1-42) com NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4. A amostra foi incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida 100 µL foram analisados por cromatografia de exclusão por tamanho.

amostra de 1 hora:

20 µL de A (1-42) em NaOH a 0,1% foram diluídos até uma concentração de 0,2 mg/mL de A (1-42) com NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4. A amostra foi incubada durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida 100 µL foram analisados por cromatografia de exclusão por tamanho.

A (1-40), NaOH de 0,1%:

1 mg de A (1-40) (Bachem, n.º de catálogo H-1194) foi dissolvido em 500 µL de NaOH a 0,1% em H_2O e agitou-se 1 minutos à temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada durante 5 minutos a 10 000 g. O sobrenadante foi recolhido. A concentração de A (1-42) no sobrenadante foi determinada de acordo com o método de Bradford (BIO-RAD).

amostra de 5 minutos:

20 µL de A (1-40) em NaOH a 0,1% foram diluídos até uma concentração de 0,2 mg/mL de A (1-40) com NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4. A amostra foi incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida 100 µL foram analisados por cromatografia de exclusão por tamanho.

amostra de 1 hora:

20 µL de A (1-40) em NaOH a 0,1% foram diluídos até uma concentração de 0,2 mg/mL de A (1-40) com NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4. A amostra foi incubada durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida 100 µL foram analisados por cromatografia de exclusão por tamanho.

Condições para a cromatografia de exclusão por tamanho (SEC):

coluna de SEC: Superose 12 HR 10/300 GL (Amersham, n.º de catálogo 17-5173-01)

Caudal: 0,5 mL/minuto

Alimentação de papel: 0,2 cm/minuto

Extinção a 214 nm: 0 - 0,2 unidades de absorção

Fase móvel: NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4

Os resultados estão apresentados na Figura 1.

A preparação de uma solução de A puramente monomérico é um grande desafio devido à forte tendência do péptido A, especialmente o monómero A (1-42), se agregar em fibrilhas. No entanto, para o rastreio e caracterização de anti-globulómeros A (20-42) que discriminam entre monómeros A (1-42) e monómeros A (1-40) deve ser usada a melhor preparação de A monomérico tecnicamente obtenível. Aqui foi testado o efeito do solvente inicial do péptido A sobre o efeito de agregação após diluição adicional em NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4. Os fornecedores de péptido A (Bachem) declaram na sua informação técnica que o A (1-42) deve ser solubilizado em NH_4OH a 0,1%. Cinco minutos à temperatura ambiente (TA) após solubilizar o A (1-42) em NH_4OH e diluição 1:10 adicional imediata em NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, uma cromatografia de exclusão por tamanho mostra os primeiros sinais de agregação de A (1-42) em precursores fibrilares com um pico secundário a 74kD. O A (1-42) monomérico corre com um pico principal com 11Dk e um patamar a 6kD. Após incubação durante uma hora à temperatura ambiente (TA) o péptido A (1-42) em NH_4OH já agregou em grande extensão em fibrilhas de A (1-42) levando a uma perda de material detectável que não entra na coluna cromatográfica de exclusão por tamanho. Se for usado ácido fórmico a 70% como solvente inicial para o péptido A (1-42) ocorre uma grande extensão de agregação após 1 hora à TA com apenas uma pequena fracção de monómero A (1-42) restante (note-se que o ácido fórmico por si próprio leva a uma alta absorção de fundo no comprimento de onda de detecção da proteína). O melhor solvente inicial para A (1-42) para prevenir a agregação é NaOH a 0,1% que mesmo após 1 hora de incubação, solubilização e diluição adicional, mostra apenas uma pequena fracção de A (1-42) agregado com a maioria do A (1-42) ainda monomérico. Um A (1-40) solubilizado inicialmente em NaOH a 0,1% não mostrou, de todo, sinais de agregação, mesmo após 1 hora de incubação à TA.

Exemplo 3: Análise semi-quantitativa visualizada por SDS-PAGE da discriminação de anticorpos selectivos para globulómero A (20-42) relativamente a fibrilhas de A (1-42).

preparação de fibrilhas de A (1-42):

1 mg de A (1-42) (Bachem, N.º Cat.: H-1368) foi dissolvido em 500 µL de NH_4OH a 0,1% em H_2O e agitou-se durante 1 minuto à temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada durante 5 minutos a 10 000 g. O sobrenadante foi recolhido. A concentração de A (1-42) no sobrenadante foi determinada de acordo com o método de Bradford (BIO-RAD).

100 µL de A (1-42) em NH_4OH a 0,1% foram misturados com 300 µL de NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, e ajustou-se a pH 7,4 com HCl a 2%. A amostra foi em seguida incubada a 37°C durante 20 horas. Depois a amostra foi centrifugada durante 10 minutos a 10 000 g. O sobrenadante foi descartado, e o resíduo foi misturado com 400 µL de NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, ressuspenso por agitação vigorosa ("vórtex") durante 1 minuto e foi centrifugado durante 10 minutos a 10 000 g. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi misturado com 400 µL de NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, ressuspenso por agitação vigorosa ("vórtex") durante 1 minuto e centrifugado durante 10 minutos a 10 000 g uma vez mais. O sobrenadante foi descartado. O resíduo foi ressuspenso em 380 µL de NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 e levou-se a agitação vigorosa ("vórtex").

Ligação de anticorpos anti-A a fibrilhas de A (1-42):

40 µL de preparação de fibrilhas de A (1-42) foram diluídos com 160 µL de NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, Tween 20 a 0,05%, pH 7,4 e agitou-se 5 minutos à temperatura ambiente, em seguida a amostra foi centrifugada durante 10 minutos a 10 000 g. O sobrenadante foi descartado, e o resíduo foi ressuspenso em 95 µL de NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, Tween 20 a 0,05%, pH 7,4. Levou-se a ressuspensão a agitação vigorosa ("vórtex").

Alíquotas de 10 µL da preparação de fibrilhas foram, cada uma, misturadas com:

a) 10 µL de NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4

b) 10 µL de 0,5 pg/µL de 5F7 em NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4

c) 10 µL de 0,5 pg/µL de 6E10 (Signet N.º: 9320) em NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4

As amostras foram incubadas a 37°C durante 20 horas, em seguida centrifugadas durante 10 minutos a 10 000 g. Os sobrenadantes foram recolhidos e misturados com 20 µL de tampão de amostra de SDS-PAGE. Os resíduos foram misturados com 50 µL de NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, Tween 20 a 0,025%, pH 7,4 e ressuspensos com agitação ("vórtex"). Em seguida as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 10 000 g. Os sobrenadantes foram descartados, e os resíduos foram misturados com 20 µL de NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, Tween 20 a 0,025%, pH 7,4, em seguida com 20 µL de tampão de amostra de SDS-PAGE. As amostras foram aplicadas a um gel de Tris/glicina a 4 - 20% para electroforese.

Parâmetros para SDS-PAGE:

tampão de amostra de SDS:
0,3 g de SDS
4 mL de Tris/HCl 1 M, pH 6,8
8 mL de glicerina
1 mL de azul de bromofenol a 1% em etanol
Encher com H_2O até 50 mL

Gel de Tris/Glicina a 4-20%: (Invitrogen, N.º Cat.: EC6025BOX)

tampão de electroforese:
7,5 g de Tris
36 g de Glicina
2,5 g de SDS
Encher com H_2O até 2,5 L

O gel é corrido a corrente constante de 20 mA.

Coloração dos géis: Azul de Coomassie R250

Os resultados estão apresentados na Figura 2.

Análise semi-quantitativa de diferentes anticorpos anti-A e sua discriminação de fibrilhas de A (1-42). As posições de anticorpos, fibrilhas de A (1-42) e monómeros A (1-42) são

marcados na borda do gel. Devido a seu tamanho, as fibrilhas de A (1-42) não podem entrar no gel de SDS-PAGE e podem ser observados no sulco do gel.

1. Marcador
2. Preparação de fibrilhas de A (1-42); controlo
3. Preparação de fibrilhas de A (1-42); + mAb 5F7; 20 horas, 37°C; sobrenadante
4. Preparação de fibrilhas de A (1-42); + mAb 5F7; 20 horas, 37°C; precipitado
5. Preparação de fibrilhas de A (1-42); + mAb 6E10; 20 horas, 37°C; sobrenadante
6. Preparação de fibrilhas de A (1-42); + mAb 6E10; 20 horas, 37°C; precipitado

A ligação relativa a A do tipo fibrilhas foi avaliada a partir de análise SDS-PAGE medindo os valores de densidade óptica (DO) da cadeia pesada dos anticorpos na fracção ligada a fibrilhas (fracção de precipitado ou peletes) e nas fracções de sobrenadantes, após centrifugação. Os anticorpos que se ligaram às fibrilhas de A devem ter co-precipitado com as fibrilhas de A e portanto encontram-se na fracção de precipitado ao passo que os anticorpos não ligados a fibrilhas de A (livres) encontram-se no sobrenadante. A percentagem de anticorpo ligado a fibrilhas de A foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

Percentagem de anticorpo ligado a fibrilhas de A =

$DO_{\text{fracção de fibrilhas}}$ x100%/($DO_{\text{fracção de fibrilhas}}$ + $DO_{\text{fracção de sobrenadante}}$)

Este procedimento foi realizado para os mAb 6E10 (Signet, N.º Cat.: 9320), 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3B10, 7C6, 7E5 e 10C1.

No cérebro com doença de Alzheimer as fibrilhas de A são um componente principal do conjunto total de péptido A . Ao atacar estas fibrilhas com anticorpos anti-A , o risco de efeitos secundários negativos é elevado devido a uma libertação de grandes quantidades de A que subsequentemente podem aumentar o risco de micro-hemorragias. Um maior risco de micro-hemorragias foi observado numa abordagem de

imunização activa com agregados fibrilares do péptido A (Bennett e Holtzman, 2005, *Neurology*, 64, 10-12; Orgogozo J, *Neurology*, 2003, 61,46-54; Schenk *et al.*, 2004, *Curr Opin Immunol*, 16, 599-606).

Ao contrário do anticorpo comercialmente disponível 6E10 (Signet 9320) que reconhece um epítopo de A linear entre os AA1-17, o anticorpo selectivo para o globulómero A (20-42), 5F7 (que até tem a selectividade mais baixa para com os globulómeros A (20-42) relativamente a outras formas de A) não se liga a fibrilhas de A (1-42) numa experiência de co-precipitação. Isto é mostrado pelo fato de que o anticorpo 5F7 após uma incubação com fibrilhas de A (1-42) permanece após uma etapa de precipitação no sobrenadante e não é co-precipitado em virtude de ficar ligado às fibrilhas de A (1-42).

Exemplo 4: Análise de desempenho cognitivo em ratinhos por meio de um teste de reconhecimento de objectos após imunização activa com monómero A (1-42) (NDH a 0,1%), globulómero A (1-42) ou globulómero A (20-42), em comparação com o tipo selvagem.

Nestas experiências, foram usados ratinhos que sobre-expressam APP humana com uma mutação pontual. A mutação pontual refere-se ao aminoácido 717 (substituição da valina por isoleucina) e foi encontrada numa família de Londres onde leva ao início de DA antes do início da sexta década de vida (Mullan *et al.*, *Nature Genetics* 2 (1992) 340-342). Os ratinhos transgénicos, aqui referidos como APP/L, foram criados, e pela primeira vez descritos por Leuven (Moechars *et al.*, *J. Biol. Chem*. 274 (1999) 6483-6492). Ratinhos APP/L fêmeas foram submetidos a imunização activa às 6 semanas de idade.

Os ratinhos receberam 100 µg de monómero A (1-42) (NDH a 0,1%), de globulómero A (1-42) ou de globulómero A (20-42) em solução salina tamponada com fosfato (PBS) misturados com uma quantidade igual de adjuvante completo de Freund, intraperitonealmente, seguido por injecções de reforço com a mesma quantidade de antigénio em adjuvante incompleto de Freund, de três em três semanas durante três meses. Durante todo o decorrer de tempo da experiência os animais foram mantidos em condições padrão num ciclo dia/noite invertido

(14 horas de luz começando às 7 pm / 10 horas de escuridão). O ganho de peso corporal ao longo do tempo da experiência foi como esperado e não diferiu de um grupo de controlo que recebeu PBS/adjuvante sozinho, sugerindo que os tratamentos com antigénio foram bem tolerados.

Aos 4,5 meses de idade a capacidade cognitiva dos ratinhos foi testada por um teste de reconhecimento de objectos da maneira descrita na técnica (Dewachter *et al. Journal of Neuroscience* 22 (2002) 3445-3453). Com esta finalidade, os ratinhos foram ambientados a uma arena e em seguida expostos durante 10 minutos a uma fase de aquisição durante a qual foram individualmente colocados na arena que agora continha dois elementos idênticos (pirâmide azul, cubo verde, cilindro amarelo de tamanho similar, *ca*. 4 cm). A duração e frequência com que o ratinho explorou os objectos foram registadas. Durante a fase de retenção, 2,5 horas depois, os ratinhos retornaram à arena que agora continha, além do objecto conhecido, um objecto desconhecido seleccionado aleatoriamente entre os outros objectos. O reconhecimento do novo objecto foi registado como o tempo durante o qual o ratinho explorou o objecto antigo relativamente ao tempo total (exploração do objecto antigo e do novo). O "índice de reconhecimento" expressa esta relação (tempo para objecto novo/tempo total). Um ratinho que não se lembra do objecto conhecido vai considerá-lo igualmente interessante ao objecto novo e gastará uma quantidade igual de tempo a explorá-lo. Por outras palavras, apresentará um índice de reconhecimento de 50%. Um ratinho que se lembra do objecto conhecido vai considerá-lo como não interessante e assim apresentará um índice de reconhecimento significativamente maior. Sabe-se que os ratinhos APP/L são cognitivamente deficientes aos 4,5 meses de idade e exibem um índice de reconhecimento na ordem do nível aleatório, isto é, 50%.

Os resultados estão apresentados na Figura 3.

Teste de reconhecimento de objectos em ratinhos. O teste reporta reconhecimento de um objecto conhecido em comparação com um desconhecido, medido em termos de comportamento explorativo durante uma fase de teste de 10 minutos. O índice de reconhecimento é definido como a

percentagem de tempo que o ratinho gasta explorando o objecto desconhecido relativamente ao tempo gasto explorando ambos os objectos. O objecto conhecido foi explorado pelo ratinho durante uma fase de aquisição de 10 minutos, três horas antes da fase de teste. Foram comparados cinco grupos de ratinhos (número n dado abaixo nas colunas). Ratinhos C57BI/6 normais (tipo selvagem) exibem um alto IR, significativamente diferente do nível aleatório (50%, isto é, tempos iguais de exploração gastos com ambos os objectos, conhecido e desconhecido) (*** = $p < 0,001$; teste t de Student). Os outros quatro grupos de ratinhos transgénicos APP foram submetidos a imunização activa três meses antes. Os imunogénios usados foram monómero A (1-42), globulómero A (1-42) e globulómero A (20-42). Solução salina tamponada com fosfato (PBS) foi usada como controlo. Diferenças significativas entre PBS e os outros grupos são indicadas com círculos: ° = $p < 0,05$; °° = $p < 0,01$ (teste t *post-hoc* depois de $p < 0,05$ em ANOVA).

Sabe-se que os ratinhos APP/L apresentam, ao contrário dos ratinhos não transgénicos, uma deficiência cognitiva aos 4,5 meses de idade, com resultados próximos do nível aleatório (isto é, 50% de índice de reconhecimento). De fato, os ratinhos tratados com PBS apresentaram comportamento aleatório, ao contrário dos ratinhos não transgénicos (tipo selvagem). A imunização com globulómero A (1-42) nativo, bem como com globulómero A (20-42), resultou num reconhecimento de objectos significativamente melhorado em ratinhos APP/L.

Como ambas as preparações de globulómeros (nativo e truncado) resultaram em melhoria da memória em animais transgénicos APP e mesmo reconhecimento superior em animais tratados com globulómero A (20-42), é razoável assumir que a indução de anticorpos contra globulómero A (20-42) truncado produzirá o melhor resultado, e que a imunização passiva com anticorpos que reagem especificamente com esta espécie representa a estratégia de tratamento ideal.

Exemplo 5: Análise *Dot-Blot* do perfil de anticorpos para diferentes formas de A após uma imunização activa de ratinhos Tg APP/L com globulómero A (20-42).

Após a imunização de ratinhos (compare-se o exemplo 4) de ratinhos APP/L (Moechars *et al.*, 1999, *J. Biol. Chem.* 274, 6483-6492) com diferentes formas de A , amostras de plasma foram avaliadas em relação a anticorpos anti-A . Com esta finalidade, foram feitas séries de diluições da formas de A (1-42) individuais variando de 100 pmol/ L a 0,01 pmol/ L em PBS suplementado com 0,2 mg/mL de BSA. 1 L de cada amostra foi aplicado em pontos sobre uma membrana de nitrocelulose. Para detecção, foram usadas amostras de plasma de ratinho correspondentes (diluídas 1:400). A imunocoloração foi realizada usando anti-IgG de ratinho conjugado com fosfatase alcalina e o reagente de coloração NBT/BCIP.

Padrões de A para *dot-blot*:

1. Globulómero A (1-42)

A preparação do globulómero A (1-42) está descrita no exemplo 1a.

2. Monómero A (1-42) pré-tratado com HFIP em Pluronic 68

3 mg de A (1-42), (Bachem Inc.; n.º Cat. H-1368) foram dissolvidos em 0,5 mL de HFIP (suspensão a 6 mg/mL) num tubo Eppendorff de 1,7 mL e agitou-se (Misturadora Eppendorff Thermo, 1400 rpm) durante 1,5 horas a 37°C até se obter uma solução límpida. A amostra foi seca num concentrador SpeedVac (1,5 h) e ressuspensa em 13,2 L de DMSO, agitada durante 10 segundos, seguindo-se tratamento com ultra-sons (20 segundos), e agitação (por exemplo, em misturadora Eppendorff Thermo, 1400 rpm) durante 10 minutos. Foram adicionados 6 mL de NaH_2PO_4 20 mM; NaCl 140 mM; Pluronic F68 a 0,1%; pH 7,4, e agitou-se durante 1 hora à temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada durante 20 minutos a 3000 g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado dissolvido em 0,6 mL de NaH_2PO_4 20 mM; NaCl 140 mM; Pluronic F68 a 1%, pH 7,4. Foram adicionados 3,4 mL de H_2O e agitou-se durante 1 hora à temperatura ambiente seguindo-se 20 minutos de centrifugação a 3000 g. Oito alíquotas de cada 0,5 mL do sobrenadante foram armazenadas a -20° para uso posterior.

3. Globulómero A (20-42)

A preparação do globulómero A (20-42) está descrita no exemplo 1c.

4. Globulómero A (12-42)

A preparação do globulómero A (12-42) está descrita no exemplo 1d.

5. Monómero A (1-40) pré-tratado com HFIP, em DMSO 5 mM

1 mg de A (1-40), (Bachem Inc, n.º Cat. H-1194) foi suspenso em 0,25 mL de HFIP (suspensão a 4 mg/mL) num tubo Eppendorff. O tubo foi agitado (por exemplo, em misturadora Eppendorff Thermo, 1400 rpm) durante 1,5 horas a 37°C para obter uma solução límpida e em seguida secou-se num concentrador SpeedVac (1,5 h). A amostra foi redissolvida em 46 L de DMSO (solução a 21,7 mg/mL = 5 mM), agitada durante 10 segundos e subsequentemente tratada com ultra-sons durante 20 segundos. Após 10 minutos de agitação (por exemplo, numa misturadora Eppendorff Thermo, 1400 rpm) a amostra é armazenada a -20°C para uso posterior.

6. Monómero A (1-42), NH_4OH a 0,1%

1 mg de A (1-42) (Bachem Inc., n.º Cat. H-1368) foi dissolvido em 0,5 mL de NH_4OH a 0,1% em H_2O (recém-preparada) (=2 mg/mL) e imediatamente agitado durante 30 segundos à temperatura ambiente para obter uma solução límpida. A amostra foi armazenada a -20°C para uso posterior.

7. Fibrilhas de A (1-42)

1 mg de A (1-42) (Bachem Inc. N.º de Catálogo: H-1368) foi dissolvido em 500 L de NH_4OH a 0,1% aquoso (Tubo Eppendorff) e a amostra foi agitada durante 1 minutos à temperatura ambiente. 100 L desta solução de A (1-42) recém-preparada foram neutralizados com 300 L de Na_2HPO_4 20 mM; NaCl 140 mM, pH 7,4. O pH foi ajustado a pH 7,4 com HCl a 1%. A amostra foi incubada durante 24 horas a 37°C e foi centrifugada (10 minutos a 10 000 g). O sobrenadante foi descartado e a pelete de fibrilhas foi ressuspensa em 400 L

de NaH_2PO_4 20 mM; NaCl 140 mM, pH 7,4, com vórtex, durante 1 minuto.

8. sAPP

Fornecida pela Sigma (n.º Cat. S9564; 25 g em NaH_2PO_4 20 mM; NaCl 140 mM; pH 7,4). A sAPP foi diluída com NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, BSA a 0,2 mg/mL, para 0,1 mg/mL (= 1 pmol/ L).

Materiais para *dot blot*:

Padrões de A :

Diluição em série de antigénios A em NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4+ BSA a 0,2 mg/mL

1) 100 pmol/ L
2) 10 pmol/ L
3) 1 pmol/ L
4) 0,1 pmol/ L
5) 0,01 pmol/ L

Nitrocelulose:

Meio de transferência Trans-Blot, Membrana de Nitrocelulose Pura (0,45 µm); BIO-RAD

Anti-Ratinho-AP:

AQ330A (Chemicon)

Reagente de detecção:

Comprimidos de NBT/BCIP (Roche)

Albumina Sérica Bovina, (BSA):

A-7888 (SIGMA)

Reagente de bloqueio:

leite de baixa gordura a 5% em TBS

Soluções tampão:

TBS
tampão Tris 25 mM / HCl - pH 7,5
+ NaCl 150 mM

TTBS
tampão Tris 25 mM / HCl - pH 7,5
+ NaCl 150 mM
+ Tween 20 a 0,05%

PBS + BSA a 0,2 mg/mL
tampão NaH_2PO_4 20 mM pH 7,4
+ NaCl 140 mM
+ BSA a 0,2 mg/mL

Solução de anticorpo I:

Amostras de plasma de ratinhos de um estudo de imunização activa com globulómero A (20-42) (diluídas 1:400 em 20 mL leite de baixa gordura a 1% em TBS)

Solução de anticorpo II:

diluição 1:5000
Anti-Ratinho-AP em leite de baixa gordura a 1% em TBS

Procedimento de *dot blot*:

1) 1 L de cada um dos diferentes padrões de A (nas suas 5 diluições em série) foi aplicado em pontos sobre a membrana de nitrocelulose a uma distância de aproximadamente 1 cm uns dos outros.

2) Os pontos dos padrões de A foram deixados secar ao ar sobre a membrana de nitrocelulose durante pelo menos 10 minutos à temperatura ambiente (TA) (= *dot blot*)

3) Bloqueio:

O *dot blot* foi incubado com 30 mL de leite de baixa gordura a 5% em TBS durante 1,5 horas à TA.

4) Lavagem:

A solução de bloqueio foi descartada e o *dot blot* foi incubado sob agitação com 20 mL de TTBS durante 10 minutos à TA

5) Solução de anticorpo I:

O tampão de lavagem foi descartado e o *dot blot* foi incubado com a solução de anticorpo I durante a noite à TA.

6) Lavagem:

A solução de anticorpo I foi descartada e o *dot blot* foi incubado sob agitação com 20 mL de TTBS durante 10 minutos à TA. A solução de lavagem foi descartada e o *dot blot* foi incubado sob agitação com 20 mL de TTBS durante 10 minutos à TA. A solução de lavagem foi descartada e o *dot blot* foi incubado sob agitação com 20 mL de TBS durante 10 minutos à TA.

7) Solução de anticorpo II:

O tampão de lavagem foi descartado e o *dot blot* foi incubado com solução de anticorpo II durante 1 hora à TA

8) Lavagem:

A solução de anticorpo II foi descartada e o *dot blot* foi incubado sob agitação com 20 mL de TTBS durante 10 minutos à TA. A solução de lavagem foi descartada e o *dot blot* foi incubado sob agitação com 20 mL de TTBS durante 10 minutos à TA. A solução de lavagem foi descartada e o *dot blot* foi incubado sob agitação com 20 mL de TBS durante 10 minutos à TA.

9) Desenvolvimento:

A solução de lavagem foi descartada. Um comprimido de NBT/BCIP foi dissolvido em 20 mL de H_2O e o *dot blot* foi incubado durante 5 minutos com esta solução. O desenvolvimento foi interrompido por lavagem intensiva com H_2O.

Os resultados estão apresentados na Figura 4.

Análise *dot blot* de anticorpos anti-A produzidos após imunização activa de ratinhos com globulómero A (20-42) para avaliar a sua especificidade no sentido de diferentes formas de A . As formas individuais de A foram aplicadas em pontos em diluições em série e incubadas com o plasma de ratinho correspondente contendo anticorpos anti-A produzidos durante a reacção imunitária. Os *dot blot* individuais correspondem a diferentes indivíduos de ratinhos imunizados.

1. Globulómero A (1-42)
2. Monómero A (1-42), pré-tratado com HFIP, em Pluronic F68 a 0,1%

3. Globulómero A (20-42)
4. Globulómero A (12-42)
5. Monómero A (1-40), pré-tratado com HFIP, DMSO 5 mM
6. Monómero A (1-42), NH_4OH a 0,1%
7. Preparação de fibrilhas de A (1-42)
8. sAPP (Sigma); (primeiro ponto: 1 pmol)

No estudo de imunização activa de ratinhos Tg APP/L demonstrou-se que a imunização com globulómero A (20-42) leva ao melhor resultado no alívio de uma deficiência cognitiva nestes ratinhos em comparação com o tratamento com PBS. Amostras de plasma de ratinhos Tg APP/L após serem activamente imunizados com globulómero A (20-42) exibem um perfil de anticorpos (reconhecimento predominante de globulómero A (20-42) e globulómero A (12-42)) que parece com o do mAb contra globulómero A (20-42) aqui reivindicado.

Exemplo 6: Concentração de péptido A (1-42) e A (1-40) solúvel e insolúveis em extractos de cérebro de ratinhos Tg APP/PS1 activamente imunizados com monómero A (1-42), globulómero A (1-42), globulómero A (20-42) ou com veículo como controlo.

Foram usados para este estudo 40 ratinhos fêmea de um modelo de ratinho transgénico duplo de doença de Alzheimer (ratinhos Tg APP/PS1) em fundo de FVBxC57BI/6J com uma idade de 4 meses. Os ratinhos Tg APP/PS1 contêm a forma de 695 aminoácidos da APP humana com a mutação V717I (a posição referindo-se à isoforma de APP mais longa) e além disso o gene da Presenilina 1 humano com a mutação A264E. Ambos os genes estão sob controlo do promotor Thy1. Os ratinhos foram gerados e caracterizados num dos laboratórios da fundação reMYND, o Experimental Genetics Group, Campus Gasthuisberg, Catholic University Leuven, pelo Prof. Fred Van Leuven *et al.*

Todos os ratinhos foram genotipados pela reacção em cadeia pela polimerase (PCR) na idade de 3 semanas e receberam um número de identidade exclusivo, uma vez conhecidos os resultados da PCR.

Os ratinhos tiveram livre acesso a água pré-filtrada e estéril (lâmpada de UV) e ração padrão para ratinho. O alimento foi armazenado sob condições secas e frias numa sala de armazenamento bem ventilada. A quantidade de água e alimento foi verificada diariamente, fornecida quando necessário e em qualquer caso renovada duas vezes por semana.

Os ratinhos foram alojados sob um ritmo de dia e noite invertido: 14 horas de luz/10 horas de escuridão, começando às 7 p.m., em gaiolas metálicas padrão tipo RVS T2 (área de 540 cm^2). As gaiolas são equipadas com pisos sólidos e camada de forragem. O número de ratinhos por gaiola foi limitado de acordo com a legislação sobre o bem-estar dos animais. Cinco dias antes do início do teste de comportamento, os ratinhos foram realojados em gaiolas macrolon Tipo 2 e transportado para o laboratório a fim de se adaptarem ao ambiente do laboratório em preparação para o teste de comportamento.

Os ratinhos receberam 100 g de monómero A (1-42) $(NH_4OH$ a 0,1%), de globulómero A (1-42) ou de globulómero A (1-42) em solução salina tamponada com fosfato (PBS) misturados com uma quantidade igual de adjuvante completo de Freund, intraperitonealmente, seguindo-se injecções de reforço com a mesma quantidade de antigénio em adjuvante incompleto de Freund de três em três semanas durante quatro meses.

Bioquímica

O A (1-40) e o A (1-42) na fracção solúvel de um hemisfério foram determinados por ELISA. Além disso, o A (1-40) e o A (1-42) da fracção de membrana insolúvel d 1 hemisfério foram determinados por ELISA.

Os ratinhos foram anestesiados com uma mistura 2:1:1 de Ketalar (cetamina), Rompun (xilazina a 2%) e atropina, e lavados trans-cardialmente com soro fisiológico a 4°C. Isto foi realizado para remover o sangue dos vasos cerebrais, um procedimento que não tem influência na integridade do órgão.

O fluido cerebrospinal (CSF) foi recolhido por meio de uma incisão nos músculos do pescoço, entre o crânio e a

primeira vértebra cervical. Foi feita uma pinctura na cisterna magna com uma agulha de calibre 26 e foram recolhidos 10-20 µL de CSF com uma pipeta de vidro fina.

O sangue foi recolhido por meio de punctura cardíaca e uma seringa de 1 mL, para tubos Eppendorf revestidos de heparina. O sangue foi centrifugado a 14 000 rpm a 4°C durante 5 minutos. O soro foi armazenado a -70°C.

Os ratinhos foram lavados transcardialmente com soro fisiológico a 4°C.

O cérebro foi removido do crânio e foram separados o prosencéfalo e rombencéfalo através de um corte no plano coronal/frontal. O cerebelo foi descartado. O prosencéfalo foi dividido uniformemente em hemisfério direito e esquerdo usando um corte sagital na linha média.

Um hemisfério foi imediatamente imerso em azoto líquido e armazenado a -70°C até análise bioquímica.

Homogeneização e fraccionamento de um hemisfério do cérebro

Os cérebros foram homogeneizados usando um Potter, um tubo de vidro (sem detergente, 2 cm^3) e um homogeneizador mecânico (650 rpm). Foi usado um volume de 6,5 x 1/2 do peso de cérebro de tampão Tris/HCl 20 mM (pH 8,5) recém-preparado com inibidores de proteinase (1 comprimido por 50 mL de tampão Tris/HCl, Complete™, Roche, Mannheim, Alemanha) como tampão de homogeneização.

As amostras foram transferidas de -70°C para um suporte de amostra com azoto líquido e cada amostra individual foi pré-aquecida por incubação na bancada durante alguns segundos antes da homogeneização. Os homogenatos foram recolhidos em tubos de centrífuga Beckman TLX e recolhidos em gelo antes da centrifugação. Entre duas amostras, o Potter e o tubo de vidro foram enxaguados cuidadosamente com água destilada (AD) sem detergentes e secos com papel absorvente.

As amostras foram centrifugadas numa ultracentrífuga pré-arrefecida (Beckman, Mannheim, Alemanha) durante 1 hora e 20 minutos a 48 000 rpm (130 500 x g) a 4°C. Devido a um número limitado de suportes de centrífuga (N=8), as

amostras foram divididas consoante o peso do cérebro (para equilibrar a centrífuga) e randomizadas a fim de dividir os diferentes grupos de tratamento ao longo das diferentes sessões de centrifugação.

O sobrenadante (fracção solúvel contendo péptidos de APP e amilóide segregado) foi separado do precipitado (fracção de membrana contendo fragmentos de APP ligados à membrana e péptidos de amilóide associados a placa no caso de ratinhos idosos). O sobrenadante foi dividido por dois tubos dos quais um foi armazenado a -20°C como reserva e o outro foi processado adicionalmente em cromatografia em coluna para concentrar os péptidos amilóides.

Os pesos dos cérebros, o volume de tampão Tris/HCl usado, as sessões de centrifugação (marcadas por cor) e a fracção solúvel no volume usada para a cromatografia em coluna, são dados exemplificativamente na tabela seguinte.

Amostra N.°	Tratamento	N.° ID do Ratinho	Peso de cérebro (W) (mg)	V Tris (=W x 6,5) (L)	50% V Tris (L)
19	x	TAB.TPF 1305	157,8	1026	513
21	x	TAB.TPF 1335	160,2	1041	521

Colunas de fase inversa pequenas (cartuchos C18-Step-Pack Vac 3cc, Waters, Massachusetts, MA) foram montadas num sistema de vácuo e lavadas com acetonitrilo a 80% em ácido trifluoroacético a 0,1% (A-TFA) seguido de TFA a 0,1% duas vezes. Em seguida, as amostras foram aplicadas e as colunas foram lavadas sucessivamente com A-TFA a 5% e 25%. Os péptidos de amilóide foram eluídos com A-TFA a 75% e os eluatos foram recolhidos em tubos de 2 mL em gelo. Os eluatos foram criodessecados num concentrador SpeedVac (Savant, Farmingdale, NY) durante a noite e redissolvidos em 330 L do diluente de amostra fornecido com os estojos ELISA.

Os precipitados foram adicionalmente fraccionados em diferentes fracções de membrana: fracção de membrana A (MFA), fracção de membrana B (MFB) contendo APP de comprimento total e fracção de membrana C (MFC) contendo amilóide associado a placa. Portanto os precipitados foram

dissolvidos em tampão TBS com inibidores de proteinase (1 comprimido por 50 mL de tampão TBS, Complete™, Roche, Mannheim, Alemanha) e a MFA foi dividida pelos dois tubos, dos quais um foi armazenado a -20°C como reserva. 60% de MFA foram adicionalmente processados com adição de NP40 (2% do volume final) e Triton X-100 (2% do volume final) em TBS com inibidores de proteinase e centrifugados durante uma hora a 27 000 rpm (98 000 x g) numa ultracentrífuga Beckman a 4°C usando um rotor oscilante (SW60). O sobrenadante (MFB) foi separado do precipitado (MFC) e ambos foram armazenados a -20°C.

Os pesos do cérebro, 60% do peso do cérebro, os volumes de tampão TBS + PI + NP40 + Triton X-100 usado e as sessões de centrifugação (marcadas pela cor) são dados exemplificativamente na tabela seguinte.

Amostra N.°	**Tratamento**	**N.° ID do Ratinho**	**Peso de cérebro (W) (L)**	**35x Peso cérebro (L)**	**Volume de tampão= 3/5 W x 15 (L)**
19	x	TAB.TPF 1305	157,8	9 5	1420
21	x	TAB.TPF 1335	160,2	96	1442

ELISA de A humano na fracção solúvel de um hemisfério

Para quantificar a quantidade de A (1-40) humano e A (1-42) humano na fracção solúvel dos homogenatos de cérebro e/ou em fluido cerebrospinal (CSF), utilizaram-se estojos de ensaio imunossorvente com enzima ligada (ELISA), comercialmente disponívelis (High Sensitivity Human Amyloid 40 and Amyloid 42 ELISA, The Genetics Company, Zurich, Suíça). O ELISA foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante. Resumidamente, padrões (uma diluição de A 1-40) ou A (1-42) sintéticos e amostras foram preparados numa placa de polipropileno de 96 poços sem capacidade de ligação de proteína (Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemanha). As diluições padrão com concentrações finais de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3 e 15,6 µg/mL e as amostras foram preparadas no diluente de amostra, fornecido com o estojo de ELISA, até um volume final de 60 L. Uma vez que os níveis de amilóide aumentam com a idade do ratinho e uma vez que a avaliação real exige que as leituras das amostras estejam dentro da

parte linear da curva padrão, as amostras para análise de A (1-40) foram diluídas 1:3, as amostras para análise de A (1-42) foram diluídas 1:6.

Amostras, padrões e brancos (50 L) foram adicionados à placa de poliestirol revestida com anti-A (anticorpo de captura reconheçe selectivamente a extremidade C-terminal do antigénio) além de um conjugado anti-A -anticorpo selectivo (anticorpo de detecção biotinilado) e incubados durante a noite a 4°C a fim de permitir a formação do complexo anticorpo-amilóide-anticorpo. No dia seguinte, um Conjugado Estreptavidina-Peroxidase foi adicionado, seguido, 30 minutos depois, pela adição de uma Mistura TMB/peróxido, resultando na conversão do substrato num produto colorido. Esta reacção foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico (1 M) e a intensidade da cor foi medida por meio de fotometria com um leitor de ELISA com um filtro de 450 nm. A quantificação do teor de A das amostras foi obtida comparando a absorvância com a curva padrão preparada com A (1-40) ou A (1-42) sintéticos.

ELISA de A humano na fracção insolúvel de um hemisfério

Para quantificar a quantidade de A (1-40) humano e ed A (1-42) humano na fracção de membrana insolúvel dos homogenatos do cérebro, as amostras de MFC foram adicionalmente processadas e dissolvidas em Guanidina 8 M em Tris/HCl 80 mM. Subsequentemente, amostras foram incubadas durante 3 horas numa termomisturadora a 25°C e pipetadas para cima e para baixo com uma pipeta de 100 L a da hora para dissolver o precipitado de MFC no tampão de guanidina. Finalmente, as amostras foram centrifugadas durante apenas 1 minuto a 4000 rpm para remover detritos.

O peso de cérebro, o peso de precipitado de MFC e o volume de tampão de guanidina 8 M são dados exemplificativamente na tabela seguinte.

Amostra N.°	**Tratamento**	**N.° ID do Ratinho**	**Peso de cérebro (W) (mg)**	**Peso de precipitado de MFC (WMFC) (40% cérebro)**	**Volume de guanidina 8M (WMFCx1,6) (**
19	x	TAB.TPF 1305	157,8	63	101
21	x	TAB.TPF 1335	160,2	64	103

Para quantificar a quantidade de A (1-40) humano e A (1-42) humano nas amostras finais, foram usados estojos de ensaio imunossorvente com enzima ligada (ELISA), comercialmente disponívelis (High Sensitivity Human Amyloid 40 and Amyloid 42 ELISA, The Genetics Company, Zurich, Suíça). O ELISA foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante, excepto na preparação dos padrões (uma diluição de A (1-40) ou A (1-42) sintéticos). As amostras foram preparadas no diluente de amostra fornecido com o estojo ELISA, num volume final de 60 L. Uma vez que a guanidina influencia os valores de DO da curva padrão, as diluições padrão com concentrações finais de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3 e 15,6 pg/mL foram preparadas em diluente de amostra com a mesma concentração de guanidina que para as amostras. Isto foi realizado numa placa de polipropileno de 96 poços sem capacidade de ligação de proteína (Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemanha).

Uma vez que os níveis de amilóide aumentam com a idade do ratinho e uma vez que a avaliação real exige que as leituras das amostras estejam na parte linear da curva padrão, as amostras para análise de A 1-40) insolúvel e A (1-42) insolúvel foram diluídas 1:500.

As amostras, padrões e brancos (50 L) foram adicionados à placa de poliestirol revestida com anti-A (anticorpo de captura reconhece selectivamente a extremidade C-terminal do antigénio) em adição a um conjugado anti-A - anticorpo selectivo (anticorpo de detecção biotinilado) e incubados durante a noite a 4°C a fim de permitir a formação do complexo anticorpo-amilóide-anticorpo. No dia seguinte, foi adicionado um conjugado estreptavidina-peroxidase, seguido, 30 minutos depois, pela adição de uma mistura TMB/peróxido, resultando na conversão do substrato num produto colorido. Esta reacção foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico (1 M) e a intensidade da cor foi medida por meio de fotometria com um leitor de ELISA com um filtro de 450 nm. A quantificação do teor de A das amostras foi obtida comparando a absorvância com a curva padrão preparada com A (1-40) ou A (1-42) sintéticos.

Os resultados estão apresentados na figura 5

Concentração de péptidos A (1-42) e A (1-40) solúveis e insolúveis nos extractos de cérebro de ratinhos Tg APP/PS1 imunizados activamente com monómero A (1-42) (NOH a 0,1%), globulómero A (1-42), globulómero A (20-42) ou veículo como controlo.

Na fracção solúvel e insolúvel de um extracto do cérebro de ratinhos Tg APP/PS1 activamente imunizados com globulómero A (20-42), o nível de péptido A (1-40) e péptido A (1-42) não é significativamente diferente do controlo de veículo. Pelo contrário, a imunização com globulómero A (1-42) e com monómero A (1-42) levam a uma redução nos níveis de A (1-40) e A (1-42) no cérebro. Isto mostra que uma abordagem de imunização dirigida ao globulómero A (20-42) não altera significativamente os níveis de A total no cérebro, mas, no entanto, é eficaz no alívio de deficiências cognitivas relacionadas com péptido A (ver exemplo 4).

Exemplo 7: Análise de desempenho cognitivo pelo teste de reconhecimento de objectos em ratinhos transgénicos APP/L após imunização passiva com anticorpos anti-globulómero A (20-42)

Nestas experiências, foram usados ratinhos que sobre-expressam APP humana com uma mutação pontual. A mutação pontual refere-se ao aminoácido 717 (substituição de valina por isoleucina) e foi encontrada numa família de Londres onde leva ao início de DA antes do início da sexta década vida (Mullan *et al.*, *Nature Genetics* 2 (1992) 340-342). Os ratinhos transgénicos, aqui referidos como APP/L, foram criados, e pela primeira vez descritos por Leuven (Moechars *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 6483-6492). Ratinhos APP/L fêmeas foram submetidos a imunização passiva aos 3 meses de idade. Os ratinhos receberam 250 g de qualquer dos anticorpos monoclonais de ratinho 5F7, 10F11 ou 7C6 em 100 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS). Durante todo o decorrer de tempo da experiência os animais foram mantidos em condições padrão num ciclo dia/noite invertido (14 horas de luz começando às 7 pm / 10 horas de escuridão). Toleraram bem a imunização passiva, sem nenhum sinal de efeitos adversos.

Após a terceira injecção (dia 15 da experiência) a capacidade cognitiva dos ratinhos foi testada através de um teste de reconhecimento de objectos da maneira descrita na técnica (Dewachter *et al. Journal of Neuroscience* 22 (2002) 3445-3453). Com esta finalidade, ao ratinhos foram ambientados a uma arena e em seguida expostos durante 10 minutos a uma fase de aquisição durante a qual foram individualmente colocados na arena que agora continha dois elementos idênticos (cubo verde ou cilindro cor-de-laranja, de tamanhos similares, *ca*. 4 cm). A duração e a frequência com que o ratinho explorou os objectos foram registadas. Durante a fase de retenção, 2,5 horas depois, os ratinhos retornaram à arena que agora continha, além do objecto conhecido, o outro objecto. O reconhecimento do objecto novo foi registado como o tempo durante o qual o ratinho explorou o objecto antigo relativamente ao tempo total (exploração do objecto antigo e do novo). O "índice de reconhecimento" expressa esta relação (tempo para objecto novo/tempo total). Um ratinho que não se lembra do objecto conhecido vai considerá-lo igualmente interessante ao objecto novo e gastará uma quantidade igual de tempo a explorá-lo. Por outras palavras, apresentará um índice de reconhecimento de 50%. Um ratinho que se lembra do objecto conhecido vai considerá-lo como não interessante e assim apresentará um índice de reconhecimento significativamente maior. Sabe-se que os ratinhos APP/L são cognitivamente deficientes aos 4,5 meses de idade e exibem um índice de reconhecimento na ordem do nível aleatório, isto é, 50%.

Os resultados estão apresentados na Figura 6.

Teste de reconhecimento de objectos em ratinhos. O teste reporta reconhecimento de um objecto conhecido em comparação com um desconhecido, medido em termos de comportamento explorativo durante uma fase de teste de 10 minutos. O índice de reconhecimento é definido como a percentagem de tempo que o ratinho gasta explorando o objecto desconhecido relativamente ao tempo gasto explorando ambos os objectos. O objecto conhecido foi explorado pelo ratinho durante uma fase de aquisição de 10 minutos, 2,5 horas antes da fase de teste.

a) ratinhos transgénicos APP foram imunizados uma vez por semana durante três semanas por injecção intraperitoneal de 250 µL do anticorpo 5F7 (n=9), do anticorpo 10F11 (n=11) ou do anticorpo 7C6 (n=11); animais de controlo receberam PBS (n=6). Diferenças significativas relativamente ao nível aleatório (50%, isto é, tempos iguais de exploração gastos com o objecto conhecido e com o desconhecido) são indicados com asteriscos* = $p < 0,05$ (teste t)

b) Comparação de todos ratinhos tratados com anticorpos (5F7, 10F11 e 7C6; (n=31)) e ratinhos tratados com solução salina tamponada com fosfato (PBS; n=6). O IR do grupo tratado com anticorpo é significativamente diferente do nível aleatório (** = $P<0,01$; teste t).

Sabe-se que os ratinhos APP/L são cognitivamente deficientes aos 4,5 meses de idade e exibem um índice de reconhecimento na ordem do nível aleatório, isto é, 50%.

De facto, os ratinhos tratados com PBS apresentaram comportamento aleatório. A imunização passiva com todos os três anticorpos (5F7, 10F11 e 7C6) resultou num índice de reconhecimento marcadamente maior. Quando comparado como grupo contra os controlos, o índice de reconhecimento é significativamente maior. Este efeito benéfico no desempenho da memória de ratinhos APP/L após administração de todos os três anticorpos sugere que um anticorpo contra o globulómero A (20-42) truncado é suficiente para alcançar uma melhoria cognitiva.

Exemplo 8: Perfil de *dot-blot* da selectividade dos anticorpos anti-globulómero A (20-42).

A fim de caracterizar a selectividade dos anticorpos monoclonais anti-globulómero A (20-42) estes foram sondados quanto a reconhecimento com diferentes formas de A . Com esta finalidade, foram feitas diluições em série de formas de A (1-42) individuais variando de 100 pmol/ L a 0,01 pmol/ L em PBS suplementado com 0,2 mg/mL de BSA. 1 L de cada amostra foi aplicado em pontos sobre uma membrana de nitrocelulose. Para detectacção, foi usado o anticorpo correspondente (0,2 µg/mL). A imunocoloração foi realizada usando anti-IgG de ratinho conjugado com peroxidase e o reagente de coloração BM Blue POD Substrate (Roche).

Padrões de A para *dot-blot*:

1. Monómero A (1-42), NH_4OH a 0,1%

1 mg de A (1-42) (Bachem Inc., n.º Cat. H-1368) foi dissolvido em 0,5 mL de NH_4OH a 0,1% em H_2O (recém-preparada) (= 2 mg/mL) e agitou-se imediatamente durante 30 segundos à temperatura ambiente para obter uma solução límpida. A amostra foi armazenada a -20°C para uso posterior.

2. Monómero A (1-40), NH_4OH a 0,1%

1 mg de A (1-40) (Bachem Inc., n.º Cat. H-1368) foi dissolvido em 0,5 mL de NH_4OH a 0,1% em H_2O (recém-preparada) (= 2 mg/mL) e agitou-se imediatamente durante 30 segundos à temperatura ambiente para obter uma solução límpida. A amostra foi armazenada a -20°C para uso posterior.

3. monómero A (1-42), NaOH a 0,1%

2,5 mg de A (1-42) (Bachem Inc., n.º Cat. H-1368) foram dissolvidos em 0,5 mL de NaOH a 0,1% em H_2O (recém-preparada) (= 5 mg/mL) e agitou-se imediatamente durante 30 segundos à temperatura ambiente para obter uma solução límpida. A amostra foi armazenada a -20°C para uso posterior.

4. Monómero A (1-40), NaOH a 0,1%

2,5 mg de A (1-40) (Bachem Inc., n.º Cat. H-1368) foram dissolvidos em 0,5 mL de NaOH a 0,1% em H_2O (recém-preparada) (= 5 mg/mL) e agitou-se imediatamente durante 30 segundos à temperatura ambiente para obter uma solução límpida. A amostra foi armazenada a -20°C para uso posterior.

5. Globulómero A (1-42)

A preparação do globulómero A 1-42 está descrita no exemplo 1a.

6. Globulómero A (12-42)

A preparação do globulómero A (12-42) está descrita no exemplo 1d.

7. Globulómero A (20-42)

A preparação do globulómero A (20-42) está descrita no exemplo 1c.

8. Fibrilhas de A (1-42)

1 mg de A (1-42) (Bachem Inc. n.º Cat.: H-1368) foi dissolvido em 500 µL de NH_4OH a 0,1% aquoso (Tubo Eppendorff) e a amostra foi agitada durante 1 minuto à temperatura ambiente. 100 L desta solução de A (1-42) recém-preparada foram neutralizados com 300 L de NaH_2PO_4 20 mM; NaCl 140 mM, pH 7,4. O pH foi ajustado a pH 7,4 com HCl a 1%. A amostra foi incubada durante 24 horas a 37°C e centrifugada (10 minutos a 10 000 g). O sobrenadante foi descartado e as fibrilhas precipitadas foram ressuspensas em 400 L de NaH_2PO_4 20 mM; NaCl 140 mM, pH 7,4, com vórtex durante 1 minuto.

9. sAPP

Fornecida por Sigma (n.º cat. S9564; 25 µg em NaH_2PO_4 20 mM; NaCl 140 mM; pH 7,4). A sAPP foi diluída para 0,1 mg/mL (= 1 pmol/ L) com NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, BSA a 0,2 mg/mL.

Materiais para *dot blot*:

Padrões de A :

Diluição em série de antigénios A em NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 + BSA a 0,2 mg/mL

1) 100 pmol/ L
2) 10 pmol/ L
3) 1 pmol/ L
4) 0,1 pmol/ L
5) 0,01 pmol/ L

Nitrocelulose:

Meio de transferência Trans-Blot Transfer, Membrana de Nitrocelulose Pura (0,45 m); BIO-RAD

Anti-Ratinho-POD:

N.º de Cat.: 715-035-150 (Jackson Imuno Research)

Reagente de detecção:

BM Blue POD Substrate, precipitação (Roche)

Albumina Sérica Bovina, (BSA):

N.º de Cat.: A-7888 (SIGMA)

Reagente de bloqueio:

leite de baixa gordura a 5% em TBS

Soluções tampão:

TBS
tampão Tris/ HCl 25 mM pH 7,5
+ NaCl 150 mM

TTBS
tampão Tris/ HCl 25 mM pH 7,5
+ NaCl 150 mM
+ Tween 20 a 0,05%

PBS + BSA a 0,2 mg/mL
tampão NaH_2PO_4 20 mM pH 7,4
+ NaCl 140 mM
+ BSA a 0,2 mg/mL

Solução de anticorpo I:

0,2 µg/mL de anticorpo diluído em 20 mL de leite de baixa gordura a 1% em TBS

Solução de anticorpo II:

diluição 1:5000
Anti-Ratinho-POD em leite de baixa gordura a 1% em TBS

Procedimento de *dot blot*:

1) 1 µL de cada um dos diferentes padrões de A (nas suas 5 diluições em série) foi aplicado em pontos sobre a membrana de nitrocelulose a uma distância de aproximadamente 1 cm uns dos outros.

2) Os pontos dos padrões de A foram deixados secar ao ar sobre a membrana de nitrocelulose durante pelo menos 10 minutos à temperatura ambiente (TA) (= *dot blot*)

3) Bloqueio:

O *dot blot* foi incubado com 30 mL de leite de baixa gordura a 5% em TBS durante 1,5 horas à TA.

4) Lavagem:

A solução de bloqueio foi descartada e o *dot blot* foi incubado sob agitação com 20 mL de TTBS durante 10 minutos à TA.

5) Solução de anticorpo I:

O tampão de lavagem foi descartado e o *dot blot* foi incubado com a solução de anticorpo I durante 2 horas à TA

6) Lavagem:

A solução de anticorpo I foi descartada e o *dot blot* foi incubado sob agitação com 20 mL de TTBS durante 10 minutos à TA. A solução de lavagem foi descartada e o *dot blot* foi incubado sob agitação com 20 mL de TTBS durante 10 minutos à TA. A solução de lavagem foi descartada e o *dot blot* foi incubado sob agitação com 20 mL de TBS durante 10 minutos à TA.

7) Solução de anticorpo II:

O tampão de lavagem foi descartado e o *dot blot* foi incubado com solução de anticorpo II durante a noite à TA

8) Lavagem:

A solução de anticorpo II foi descartada e o *dot blot* foi incubado sob agitação com 20 mL de TTBS durante 10 minutos à TA. A solução de lavagem foi descartada e o *dot blot* foi incubado sob agitação com 20 mL de TTBS durante 10 minutos à TA. A solução de lavagem foi descartada e o *dot blot* foi incubado sob agitação com 20 mL de TBS durante 10 minutos à TA.

9) Desenvolvimento:

A solução de lavagem foi descartada. O *dot blot* foi desenvolvido com 10 mL de BM Blue POD Substrate durante 10 minutos. O desenvolvimento foi interrompido por lavagem intensiva do *dot blot* com H_2O. A avaliação quantitativa foi feita usando uma análise densitométrica (densitómetro GS800 (BioRad) e o pacote de *software* Quantity one, Versão 4.0.5 (BioRad)) da intensidade dos pontos. Foram avaliados apenas pontos que tinham uma densidade relativa superior a 20% da densidade relativa do último ponto identificado opticamente de forma inequívoca do globulómero A (20-42). Este valor limiar foi determinado para cada *dot blot* independentemente. O valor calculado indica a relação entre reconhecimento de globulómero A (20-42) e a respectiva formas de A para esse anticorpo.

Os resultados estão apresentados na Figura 7.

Análise *dot blot* da especificidade de diferentes anticorpos anti-A (6E10, 5F7, 4B7, 10F11, 6A2, 4D10,2F2; 3B10, 7C6, 7E5, 10C1) no sentido de diferentes formas de A . Os anticorpos monoclonais testados foram obtidos (excepto o 6E10) por imunização activa de ratinhos com globulómero A (20-42), seguida de selecção das células de hibridam fundidas. As formas de A individuais foram aplicadas me diluições em série e incubadas com os respectivos anticorpos para reacção imunitária.

1. Monómero A (1-42), NaOH a 0,1%
2. Monómero A (1-40), NaOH a 0,1%
3. Monómero A (1-42), NaOH a 0,1%
4. Monómero A (1-40), NaOH a 0,1%
5. Globulómero A (1-42)
6. Globulómero A (12-42)
7. Globulómero A (20-42)
8. Preparação de fibrilhas de A (1-42)
9. sAPP (Sigma); (primeiro ponto: 1 pmol)

Os mAb selectivos anti-globulómero A (20-42) pode ser divididos em 3 classes relativamente à discriminação de globulómero A (1-42) e globulómero A (12-42). A primeira classe, compreendendo os anticorpos 6A2, 5F7 e 2F2, reconhece preferencialmente o globulómero A (20-42) e até certo ponto o globulómero A (1-42) (e também o globulómero A (12-42)). A segunda classe, compreendendo os anticorpos 10F11, 4D10 e 3B10, reconhece preferencialmente o globulómero A (20-42) e também reconhece o globulómero A (12-42) embora em menor extensão, e não reconhece significativamente o globulómero A (1-42). A terceira classe, compreendendo os anticorpos 7C6, 4B7, 7E5 e 10C1, reconhece o globulómero A (20-42) mas não mostrou reconhecimento significativo dos outros. Nenhuma das três classes reconhece significativamente o A (1-42) monomérico, o A (1-40) monomérico, fibrilhas de A (1-42) ou sAPP

O perfil de selectividade dos anticorpos anti-globulómero A (20-42) mostrou que o índice de reconhecimento significativamente elevado na imunização passiva (na figura 6) tem que ser principalmente devido a um reconhecimento selectivo do globulómero A (20-42) e do globulómero A (12-42) truncados e, em muito menor extensão, do globulómero A (1-42), e não reconhecimento do A (1-42) monomérico, do A (1-40) monomérico, de fibrilhas de A (1-42) ou de sAPP .

Exemplo 9: Análise *in situ* da reacção específica de anticorpos selectivos para A (20-42) com péptido A fibrilhar na forma de placas de A em ratinhos TG2576 idosos e A -amilóide em vasos meníngeos.

Para estas experiências, foi usado material de cérebro de ratinhos TG2576 de 19 meses de idade (Hsiao *et al.*, 1996, *Science*; 274(5284), 99-102) ou de ratinhos APP/LxPS1 de 9 meses de idade (descrição anterior; ReMYND, Leuven, Bélgica) ou material de autópsia de dois pacientes com doença de Alzheimer (RZ16 e RZ55; obtido de BrainNet, Munich). Os ratinhos sobre-expressam APP humana com a denominada mutação Sueca (K670N/M671L; Tg2576) ou a denominada mutação de Londres (V717I) além do gene de Presenilina 1 humana com a mutação A264E (APP/LxPS1) formaram depósitos de -amilóide no parênquima cerebral a

cerca dos 7-11 meses de idade e depósitos de -amilóide em vasos cerebrais maiores a cerca dos 18 meses de idade (Tg2576). Os animais foram profundamente anestesiados e perfundidos transcardialmente com solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,1 M para lavar o sangue. Em seguida o cérebro foi removido do crânio e dividido longitudinalmente. Um hemisfério do cérebro congelado imediatamente, o outro foi fixado por imersão em paraformaldeído a 4%. O hemisfério fixado por imersão foi crioprotegido embebendo-o em sacarose a 30% em PBS e foi montado num micrótomo de congelação. Todo o prosencéfalo foi cortado em secções de 40 µm que foram recolhidas em PBS e usadas para o procedimento de coloração subsequente. O material de cérebro humano era um bloco profundamente congelado do neocórtex de cerca de 1 cm^3. Uma pequena parte do bloco foi fixada por imersão em paraformaldeído a 4% e tratada adicionalmente como o material do cérebro de ratinho.

Secções individuais foram coradas com vermelho do Congo usando o seguinte protocolo:

Material:

- Estojo de corante vermelho do Congo para amilóide (Sigma-Aldrich; HT-60), consistindo em solução de NaCl alcoólica, solução de NaOH e solução de vermelho do Congo
- cuvetes de coloração
- lâminas de microscópio SuperfrostPlus e lamelas
- Etanol, Xilol, meio de embebimento

Reagentes:

- NaOH diluído 1 : 100 com solução de NaCl produz solução salina alcalina
- solução salina alcalina diluída 1 : 100 com solução de vermelho do Congo produz solução de vermelho do Congo alcalina (preparar não mais que 15 minutos antes do uso, filtrar)
- montar secções na lâmina e deixar secar

- incubar a lâmina em cuvete de coloração, primeiro durante 30 - 40 minutos em solução salina alcalina, em seguida durante 30 - 40 minutos em solução de vermelho do Congo alcalina

- enxaguar três vezes com etanol fresco e embeber sobre xilol

A coloração foi primeiro fotografada usando um microscópio Zeiss Axioplan e avaliada qualitativamente. A cor vermelha indicou depósitos de amilóide tanto na forma de placas como em grandes vasos meníngeos. Estes Resultados estão apresentados na Fig. 8A. Mais tarde, a avaliação da coloração com anticorpos focou-se nestas estruturas.

A coloração com anticorpos foi realizada incubando as secções com uma solução contendo 0,07-7,0 µg/mL do respectivo anticorpo de acordo com o seguinte protocolo:

Materiais:

- Solução de lavagem TBST (Solução salina tamponada Tris com Tween 20; 10 x concentrada; DakoCytomation; S3306 1:10 em Aqua bidest.)

- H_2O_2 a 0,3 % em metanol

- soro de burro (Serotec), a 5% em TBST

- anticorpo monoclonal de ratinho anti-globulómero diluído em TBST

- anticorpo secundário: anticorpo de burro anti-ratinho biotinilado (Jackson Immuno; 715-065-150; diluído 1:500 em TBST)

- StreptABComplex (DakoCytomation; K 0377)

- Diaminobenzidina do Estojo de Substrato de Peroxidase (=DAB; Vector Laboratories; SK-4100)

- lâminas de microscópio SuperFrost Plus e lamelas

- meio de embebimento sem xilol (Medite; X-tra Kitt)

Procedimento:

- transferir secções flutuantes para H_2O_2 a 0,3% arrefecido em gelo e incubar durante 30 minutos
- lavar durante 5 minutos com tampão TBST
- incubar com soro de burro/TBST durante 20 minutos
- incubar com anticorpo primário durante 24 horas à temperatura ambiente
- lavar com tampão TBST durante 5 minutos
- incubar com soro de bloqueio do estojo de peroxidase Vectastain Elite ABC durante 20 minutos
- lavar com tampão TBST durante 5 minutos
- incubar com anticorpo secundário durante 60 minutos à temperatura ambiente
- lavar com tampão TBST durante 5 minutos
- incubar com StreptABComplex durante 60 minutos à temperatura ambiente
- lavar com tampão TBST durante 5 minutos
- incubar com DAB do estojo de peroxidase Vectastain Elite ABC durante 20 minutos
- montar a secção em lâminas, secá-las no ar, desidratá-las com álcool e embebê-las.

Para além da inspecção visual da coloração, a coloração da placa foi adicionalmente quantificada excisando graficamente 10 placas seleccionadas aleatoriamente das imagens histológicas usando o sistema de análise de imagem ImagePro 5.0 e determinando o seu valor médio na escala de cinzintos. Os valores de densidade óptica foram calculados a partir dos valores da escala de cinzentos subtraindo a densidade média de fundo do material corado à densidade de placas de amilóide (0% - nenhuma coloração da placas acima do fundo circundante, 100% - nenhuma transmissão/coloração máxima), e as diferenças entre controlo e anticorpos e entre 6G1 e os anticorpos selectivos para A (20-42),

respectivamente, foram testados quanto a significância estatística com ANOVA.

Os resultados da coloração em ratinhos Tg2576 e APP/LXPS1 são apresentados na Figura 8 B-D e H.

Ligação de diferentes anticorpos a uma concentração de 0,7 µg/mL em secções transversais dos neocórtices de ratinhos TG 2576 transgénicos aos 19 meses de idade:

C) Depósitos de A parenquimatosos (placas de amilóide) foram corados apenas com 6G1 e 6E10 mas não com os anticorpos selectivos para globulómeros (isto é, 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3B10, 7C6, 7E5 e 10C1).

D) Todos anticorpos selectivos para globulómeros (isto é, 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3B10, 7C6, 7E5 e 10C1) apresentaram significativamente menos coloração de placas parenquimatosas comparativamente com os anticorpos 6E10 e 4G8 comercialmente disponíveis.

Ligação de diferentes anticorpos a uma concentração de 0,07-7,0 µg/mL em secções transversais dos neocórtex de ratinhos APP/LxPS1 transgénicos aos 11 meses de idade:

E) Depósitos de A parenquimatosos (placas de amilóide) foram significativamente mais e em menores concentrações corados com 6G1, 6E10 e 4G8 do que com os anticorpos selectivos para globulómero (isto é, 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3810, 7C6, 7E5 e 10C1).

Todos os depósitos de amilóide foram verificados por coloração congofílica antes (vermelho do Congo; ver Fig. 8A). Barra = 100 pm.

A avaliação de depósitos de DAB castanhos mostrou que os anticorpos 6G1 e 6E10 não selectivos para A coram placas e vasos meníngeos, ao passo que os anticorpos selectivos para o globulómero A (20-42), 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3B10, 7C6, 7E5 e 10C1 não os coraram. Esta verificação demonstra que não existe, ou que existe notavelmente menos ligação desses anticorpos a fibrilhas de A ou outras espécie de A presentes nas estruturas de amilóide *in vivo*. Supostamente, esta ligação reduzida reduz o perigo de efeitos secundários induzidos por uma

dissolução demasiado rápida das placas e subsequente aumento de Aβ solúvel, ou neuroinflamação devida à interacção de anticorpos ligados à placa com a microglia.

Os resultado da coloração em cérebro com doença de Alzheimer humano são apresentados na Figura 8 B, F-H.

Ligação de diferentes anticorpos a uma concentração de 0,7 µg/mL em secções transversais do neocórtex de paciente RZ55:

B) Depósitos de Aβ parenquimatosos (placas de amilóide) foram corados apenas com 6G1 e 6E10 mas não com os anticorpos selectivos para globulómeros (isto é, 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3B10, 7C6, 7E5 e 10C1).

F) Todos os anticorpos selectivos para globulómeros (isto é, 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3B10, 7C6, 7E5 e 10C1) apresentaram significativamente menos coloração comparativamente com os anticorpos 6E10 e 4G8 comercialmente disponíveis.

H) Depósitos de Aβ vasculares (setas) foram corados apenas com 6G1 e 6E10, mas não com anticorpos selectivos para globulómeros (isto é, 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3B10, 7C6, 7E5 e 10C1).

Ligação de diferentes anticorpos a uma concentração de 0,07-7,0 µg/mL em secções transversais do neocórtex de ratinhos APP/LxPSI transgénicos aos 11 meses de idade:

G) Depósitos de Aβ parenquimatosos (placas de amilóide) foram significativamente mais e em menores concentrações corados com 6G1, 6E10 e 4G8 do que com os anticorpos selectivos para globulómeros (isto é, 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3B10, 7C6, 7E5 e 10C1).

Todos os depósitos de amilóide foram verificados por coloração congofílica antes (vermelho do Congo; ver Fig. 8A).

A avaliação de depósitos de DAB castanhos mostrou que os anticorpos 6G1 e 6E10 não selectivos para Aβ coraram placas e vasos meníngeos, ao passo que os anticorpos selectivos para globulómero Aβ (20-42), 5F7, 2F2, 6A2, 4D10, 10F11, 3810, 7C6, 7E5 e 10C1 não os coraram. Os anticorpos

6E10 e 4G8 comercialmente disponíveis apresentaram coloração mais forte comparativamente com os anticorpos selectivos para globulómero, mas menos coloração do que 6G1. Esta verificação confirma o padrão de coloração em ratinhos transgénicos APP onde não existe, ou existe notavelmente menos ligação dos anticorpos selectivos para globulómero a fibrilhas de A ou outras espécies de A presentes nas estruturas de amilóide *in vivo*. Supostamente esta ligação reduzida a amilóide humano reduz o perigo de efeitos secundários induzidos por uma dissolução demasiado rápida de placas e subsequente aumento de A solúvel, ou neuroinflamação devido à interacção dos anticorpos ligados à placa com a microglia.

Exemplo 10: Título de anticorpos anti-A e perfil de selectividade em *dot-blot* em plasma de ratinhos TG2576 aproximadamente um ano após a imunização activa.

Aproximadamente um ano após a última imunização (com globulómero A (20-42), globulómero A (12-42), monómero A (1-42) e veículo) de ratinhos Tg 2576 (do exemplo 9) foram avaliadas amostras de plasma quanto a anticorpos anti-A produzidos e ainda presentes. Com esta finalidade, foram feitas diluições em série das diferentes formas de A (1-42) na gama de concentrações de 100 pmol/µL a 0,01 pmol/µL em PBS + BSA a 0,2 mg/mL. De cada amostra, foi aplicado 1 µL numa membrana de nitrocelulose. A detecção foi realizada com amostras de plasma de ratinhos adequadas (diluídas 1:400). A coloração foi feita com anti-IgG de ratinho conjugado com fosfatase alcalina e adição do reagente de coloração NBT/BCIP.

Padrões de A para *dot-blot*:

1. Globulómero A (1-42)

A preparação do globulómero A (1-42) está descrita no exemplo 1a.

2. Monómero A (1-42) pré-tratado com HFIP em Pluronic 68

3 mg de A (1-42), (Bachem Inc.; n.º Cat. H-1368) foram dissolvidos em 0,5 mL de HFIP (suspensão a 6 mg/mL) num tubo Eppendorff de 1,7 mL e agitou-se (Misturadora Eppendorff

Thermo, 1400 rpm) durante 1,5 horas a 37°C até se obter uma solução límpida. A amostra foi seca num concentrador SpeedVac (1,5 horas) e ressuspensa em 13,2 µL de DMSO, agitada durante 10 segundos, seguindo-se tratamento com ultra-sons (20 segundos), e agitação (por exemplo, em misturadora Eppendorff Thermo, 1400 rpm) durante 10 minutos. Foram adicionados 6 mL de NaH_2PO_4 20 mM; NaCl 140 mM; Pluronic F68 a 0,1%; pH 7,4 e agitou-se durante 1 hora à temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada durante 20 minutos a 3000 g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado dissolvido em 0,6 mL de NaH_2PO_4 20 mM; NaCl 140 mM; Pluronic F68 a 1%, pH 7,4. Foram adicionados 3,4 mL de H_2O e agitou-se durante 1 hora à temperatura ambiente seguindo-se centrifugação durante 20 minutos a 3000 g. Oito alíquotas de cada 0,5 mL do sobrenadante foram armazenadas a -20° para uso posterior.

3. Globulómero A (20-42)

A preparação do globulómero A (20-42) está descrita no exemplo 1c.

4. Globulómero A (12-42)

A preparação do globulómero A (1-42) está descrita no exemplo 1d.

5. Monómero A (1-40), pré-tratado com HFIP, 5 mM em DMSO

1 mg de A (1-40), (Bachem Inc, n.º Cat. H-1194) foi suspenso em 0,25 mL de HFIP (suspensão a 4 mg/mL) num tubo Eppendorff. O tubo foi agitado (por exemplo, em misturadora Eppendorff Thermo, 1400 rpm) durante 1,5 horas a 37°C para obter uma solução límpida e em seguida secou-se num concentrador SpeedVac (durante 1,5 horas). A amostra foi redissolvida em 46 µL de DMSO (solução 21,7 mg/mL = 5 mM), agitou-se durante 10 segundos e subsequentemente tratou-se com ultra-sons durante 20 segundos. Após agitação (por exemplo, em misturadora Eppendorff Thermo, 1400 rpm) durante 10 minutos a amostra é armazenada a -20°C para uso posterior.

6. Monómero A (1-42), NH_4OH a 0,1%

1 mg de A (1-42) (Bachem Inc., n.º Cat. H-1368) foi dissolvido em 0,5 mL de NH_4OH a 0,1% em H_2O (recém-preparada) (= 2 mg/mL) e agitou-se imediatamente durante 30 segundos à temperatura ambiente para obter uma solução límpida. A amostra foi armazenada a -20°C para uso posterior.

7. Fibrilhas de A (1-42)

1 mg de A (1-42) (Bachem Inc. N.º de Catálogo: H-1368) foi redissolvido em 500 µL de NH_4OH aquoso a 0,1% (tubo Eppendorff) e a amostra foi agitada durante 1 minuto à temperatura ambiente. 100 µL desta solução de A (1-42) recém-preparada foram neutralizados com 300 µL de NaH_2PO_4 20 mM; NaCl 140 mM, pH 7,4. O pH foi ajustado a pH 7,4 com HCl a 1%. A amostra foi incubada durante 24 horas a 37°C e centrifugada (10 minutos a 10 000 g). O sobrenadante foi descartado e o precipitado de fibrilhas foi ressuspenso em 400 µL de NaH_2PO_4 20 mM; NaCl 140 mM, pH 7,4, com vórtex, durante 1 minuto.

8. sAPP

Fornecida por Sigma (n.º de cat. S9564; 25 g em NaH_2PO_4 20 mM; NaCl 140 mM; pH 7,4). A sAPP foi diluída com NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, BSA a 0,2 mg/mL, para 0,1 mg/mL (= 1 pmol/ L).

Materiais para *dot blot*:

Padrões de A :

Diluição em série de antigénios A em NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 + BSA a 0,2 mg/mL

1) 100 pmol/ L
2) 10 pmol/ L
3) 1 pmol/ L
4) 0,1 pmol/ L
5) 0,01 pmol/ L

Nitrocelulose:

Meio de transferência Trans-Blot Transfer, Membrana de Nitrocelulose Pura (0,45 m); BIO-RAD

Anti-Ratinho-AP:

AQ330A (Chemicon)

Reagente de detecção:

Comprimidos de NBT/BCIP (Roche)

Albumina Sérica Bovina, (BSA):

A-7888 (Fa. SIGMA)

Reagente de bloqueio:

leite de baixa gordura a 5% em TBS

Soluções tampão:

TBS
tampão Tris 25 mM/HCl - pH 7,5
+ NaCl 150 mM

TTBS
tampão Tris 25 mM/HCl - pH 7,5
+ NaCl 150 mM
+ Tween 20 a 0,05%

PBS + BSA a 0,2 mg/mL
tampão NaH_2PO_4 20 mM, pH 7,4
+NaCl 140 mM
+BSA a 0,2 mg/mL

Solução de anticorpo I:

Plasma dos ratinhos TG2576 activamente imunizados diluído 1/400 em 20 mL de leite de baixa gordura a 1% em TBS

Solução de anticorpo II:

diluição 1:5000
Anti-Ratinho-AP em leite de baixa gordura a 1% em TBS

Procedimento de *dot blot*:

1) 1 µL de cada um dos diferentes padrões de A (nas suas 5 diluições em série) foi aplicado em pontos sobre a membrana de nitrocelulose com aproximadamente 1 cm de distância uns dos outros.

2) Os pontos dos padrões de A ão deixados secar ao ar na membrana de nitrocelulose durante pelo menos 10 minutos à temperatura ambiente (TA) (= *dot blot*)

3) Bloqueio:

O *dot blot* é incubado com 30 mL de leite de baixa gordura a 5% em TBS durante 1,5 horas à TA.

4) Lavagem:

A solução de bloqueio é descartada e o *dot blot* é incubado sob agitação com 20 mL de TTBS durante 10 minutos à TA.

5) Solução de anticorpo I:

O tampão de lavagem é descartado e o *dot blot* é incubado com solução de anticorpo I durante a noite à TA

6) Lavagem:

A solução de anticorpo I é descartada e o *dot blot* é incubado sob agitação com 20 mL de TTBS durante 10 minutos à TA. A solução de lavagem é descartada e o *dot blot* é incubado sob agitação com 20 mL de TTBS durante 10 minutos à TA. A solução de lavagem é descartada e o *dot blot* é incubado sob agitação com 20 mL de TBS durante 10 minutos à TA.

7) Solução de anticorpo II:

O tampão de lavagem é descartado e o *dot blot* é incubado com solução de anticorpo II durante 1 hora à TA.

8) Lavagem:

A solução de anticorpo II é descartada e o *dot blot* é incubado sob agitação com 20 mL de TTBS durante 10 minutos à TA. A solução de lavagem é descartada e o *dot blot* é incubado sob agitação com 20 mL de TTBS durante 10 minutos à TA. A solução de lavagem é descartada e o *dot blot* é incubado sob agitação com 20 mL de TBS durante 10 minutos à TA.

9. Desenvolvimento:

A solução de lavagem é descartada. 1 comprimido de NBT/BCIP é dissolvido em 20 mL de H_2O e o *dot blot* é incubado durante 5 minutos com esta solução. O desenvolvimento é interrompido por lavagem intensiva com H_2O.

Os resultados estão apresentados na Figura 9.

Soros de diferentes grupos de imunização: a) globulómeros A (20-42); b) globulómeros A (12-42); c) monómero A (1-42), NaOH a 0,1%; d) controlo de veículo, foram testados contra diferentes formas de A num *dot blot* para diferenciar perfis de anticorpos.

1. globulómero A (1-42)
2. monómero A (1-42), pré-tratado com HFIP, em Pluronic F68 a 0,1%
3. globulómero A (20-42)
4. globulómero A (12-42)
5. monómero A (1-40), pré-tratado com HFIP, 5 mM em DMSO
6. monómero A (1-42), dissolvido em NaOH a 0,1%
7. preparação de fibrilhas de A (1-42)
8. sAPP (Sigma); (primeiro ponto: 1 pmol)

Ao contrário das imunizações activas tanto com veículo, como controlo, como com monómero A (1-42), a imunização com globulómero A (20-42) ou globulómero A (12-42) apresentam, mesmo após aproximadamente um ano da última imunização, um alto título de anticorpos. Estes anticorpos são selectivos para o globulómero A (20-42) no caso da imunização com globulómero A (20-42) ou selectivos para o globulómero A (20-42) e o globulómero A (12-42) no caso da imunização com globulómero A (12-42). Isto mostra que o globulómero A (20-42) e o globulómero A (12-42) truncados representam um antigénio muito bom e que os anticorpos dirigidos contra eles persistem muito tempo *in vivo*.

(Note-se que em alguns *dot blot* é observado um sinal de coloração não específica que é muito provavelmente uma

reacção cruzada de anticorpos murinos com a BSA usada nas diluições em série dos péptidos A .)

Exemplo 11: Níveis Cerebrais de epítopos de globulómeros A (20-42) em pacientes com doença de Alzheimer.

Extracto de cérebro de SDS-DTT:

Amostras de cérebro com DA: RZ 16; RZ 52 e RZ 55 (obtidas de Brain Net, Munich);

Amostra de controlo: RZ 92 (obtidas de Brain Net, Munich)

Um comprimido de inibidor de protease completo (Complete Protease Inhibitor, Roche, N.º Cat. 1697 498) é dissolvido em 1 mL de H_2O (= solução inibidora de protease). 100 mg de amostra de cérebro com DA são homogeneizados em 2,5 mL de NaH_2PO_4, NaCl 140 mM, Tween 20 a 0,05%, BSA a 0,5% (suplementado com 25 µL de solução inibidora de protease) com 20 batidas num recipiente de vidro. A suspensão é tratada com ultra-sons durante 30 segundos em gelo, em seguida é incubada a 37°C durante 16 horas. A suspensão é centrifugada a 100 000 g e 8°C durante uma hora, em seguida o sobrenadante é recolhido. O resíduo é dissolvido em NaH_2PO_4 5 mM, NaCl 35 mM, pH 7,4 e homogeneizado com 10 batidas num recipiente de vidro. 75 µL de SDS a 10% e 125 µL de DTT a 0,16 mg/mL são adicionados e agita-se durante 20 minutos à temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada durante 10 minutos a 10 000 g, e o sobrenadante é armazenado durante a noite a -20°C. Antes do uso, o sobrenadante é descongelado e centrifugado durante mais 10 minutos a 10 000 g. O sobrenadante (=extrato de cérebro SDS/DTT) é usado para ELISA.

a) ELISA em sanduíche para epítopo do globulómero A (2042)

Lista de reagentes:

1. F96 Cert. Maxisorp NUNC-Imuno Plate (N.º de Cat.: 439454)

2. Anticorpo de ligação: 5F7, 7C6, 10F11

3. Tampão de acoplamento:

hidrogenocarbonato de sódio 100 mM, pH 9,6

4. Reagente de bloqueio para ELISA (Roche Diagnostics GmbH N.º de Cat.: 1112589)

5. tampão PBST:

NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, Tween 20 a 0,05%, pH 7,4

6. Padrão de calibração de A (20-42)

7. Anticorpo primário:

anti-A pRAb BA199; solução de IgG purificado por afinidade (por globulómero A (1-42)-Sepharose) em PBS; conc.: 0,22 mg/mL

8. Anticorpo secundário:

conjugado anti-coelho-POD; (Jackson ImmunoResearch, N.º de Cat.: 111-036-045)

9. Desenvolvimento:

- TMB; (Roche Diagnostics GmbH N.º de Cat.: 92817060) 42 mM em DMSO
- H_2O_2 a 3% em H_2O
- acetato de sódio 100 mM, pH 4,9
- Solução de paragem: ácido sulfúrico 2 M

Preparação de reagentes:

1. Anticorpo de ligação:

Os anticorpos de ligação individuais 5F7, 7C6 e 10F11 são diluídos numa concentração final de 0,7 µg/mL em tampão de acoplamento.

2. Reagente de bloqueio:

Para preparação da solução de bloqueio de reserva o reagente de bloqueio é dissolvido em 100 mL de H_2O e armazenado a -20°C em alíquotas de 10 mL cada. 3 mL da solução de bloqueio de reserva são diluídos com 27 mL de H_2O para bloquear uma placa ELISA.

3. Padrão de calibração de A (20-42) (CS1)

A preparação do globulómero A (1-42) está descrita no exemplo 1a.

A concentração proteínica do globulómero A (20-42) foi determinada (6,81 mg/mL) após Bradford (BioRad). 14,68 µL de globulómero A (20-42) (6,81 mg/mL) são diluídos em 10 mL de NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, Tween 20 a 0,05%, pH 7,4, BSA a 0,5% (= 10 µg/mL). 10 µL da solução a 10 µg/mL são adicionalmente diluídos em 10 mL de NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 140 mM, Tween 20 a 0,05%, pH 7,4, BSA a 0,5% (10 ng/mL = CS1)

Padrões de calibração para A (20-42):

padrão de Calibração	volume de padrão de calibração	PBST + BSA a 0,5%	concentração final de A (20-42) (pg/mL)
CS1.1	1 mL de CS1	0 mL	10 000
CS1.2	0,316 mL de CS1.1	0,684 mL	3160
CS1.3	0,316 mL de CS1.2	0,684 mL	1000
CS1.4	0,316 mL de CS1.3	0,684 mL	316
CS1.5	0,316 mL de CS1.4	0,684 mL	100
CS1.6	0,316 mL de CS1.5	0,684 mL	31,6
CS1.7	0,316 mL de CS1.6	0,684 mL	10
CS1.8	0,0	1,0 mL	0,0

extractos de cérebro em SDS/DTT:

extractos de cérebro em SDS/DTT = E#

(# representa as 4 amostras cerebrais humanas (1) RZ 16; (2) RZ 52; (3) RZ 55; (4) RZ 92)

amostra de extracção	volume de amostra de extracção	PBST + BSA a 0,5%	factor de diluição
E#.1	1 mL de E#	0,O mL	direto
E#.2	0,316 mL de E#.1	0,684 mL	1:3,16
E#.3	0,316 mL de E#.1	0,684 mL	1:10
E#.4	0,316 mL de E#.1	0,684 mL	1:31,6

4. Anticorpo primário:

A solução de reserva de pRAb anti-A é diluída para 0,05 µg/mL em PBST + BSA a 0,5%. A solução do anticorpo é usada imediatamente.

5. Anticorpo secundário:

Conjugado POD-anti-coelho liofilizado é dissolvido em 0,5 mL de H_2O e misturado com 500 µL de glicerol. O anticorpo concentrado é em seguida armazenado a -20°C em alíquotas de 100 µL. O concentrado é diluído 1:10 000 em tampão PBST. A solução de anticorpo é usada imediatamente.

6. Solução de TMB:

20 mL de acetato de sódio 100 mM, pH 4,9, são misturados com 200 µL de solução de TMB e 29,5 L de peróxido hidrogénio a 3%. Esta solução é usada imediatamente.

Placa ELISA para A (20-42):

Os padrões de calibração (CS1.1-CS1.8) e os extractos de cérebro em SDS/DTT das 4 amostras cerebrais humanas (1) RZ 16; (2) RZ 52; (3) RZ 55; (4) RZ 92 (=E1-E4 nas suas 4 diluições em série E#.1-E#.4) são determinadas em dobro:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CS1.1	CS1.1	E1.1	E1.1	E3.1	E3.1						
B	CS1.2	CS1.2	E1.2	E1.2	E3.2	E3.2						
C	CS1.3	CS1.3	E1.3	E1.3	E3.3	E3.3						
D	CS1.4	CS1.4	E1.4	E1.4	E3.4	E3.4						
E	CS1.5	CS1.5	E2.1	E2.1	E4.1	E4.1						
F	CS1.6	CS1.6	E2.2	E2.2	E4.2	E4.2						
G	CS1.7	CS1.7	E2.3	E2.3	E4.3	E4.3						
H	CS1.8	CS1.8	E2.4	E2.4	E4.4	E4.4						

Este ELISA é realizado com cada um dos anticorpos monoclonais de ligação 5F7, 7C6, 10F11.

Procedimento

1. Adicionar 100 µL de solução de mAb por poço. Incubar a placa de ELISA durante a noite a +6ºC (refrigerador).

2. Decantar a solução de anticorpo e lavar os poços três vezes com 250 µL de tampão PBST cada.

3. Adicionar 250 µL/poço de solução de bloqueio. Incubar durante 2 horas à temperatura ambiente.

4. Decantar a solução de bloqueio e lavar os poços três vezes com 250 µL de tampão PBST cada.

5. Adicionar 100 µL/poço de cada um dos padrões de calibração e extractos de cérebro em SDS/DTT. Incubar a placa durante 2 horas à temperatura ambiente, em seguida durante a noite a 6ºC.

6. Decantar as solução de padrões de calibração e extractos de cérebro em SDS/DTT e lavar os poços três vezes com 250 µL de tampão PBST cada.

7. Adicionar 200 µL /poço de solução de anticorpo primário e incubar durante 1 hora à temperatura ambiente.

8. Decantar a solução de anticorpo primário e lavar os poços três vezes com 250 µL de tampão PBST cada.

9. Adicionar 200 µL /poço de solução de anticorpo secundário e incubar durante 1 hora à temperatura ambiente.

10. Decantar a solução de anticorpo secundário e lavar os poços três vezes com 250 µL de tampão PBST cada.

11. Adicionar 100 µL /poço de solução de TMB.

12. Monitorar a cor da placa durante o desenvolvimento (5 - 15 minutos à temperatura ambiente) e terminar a reacção adicionando 50 µL /poço de solução de paragem quando for desenvolvida uma cor apropriada.

13. Medir a extinção a 450 nm.

14. Calcular os resultados usando a calibração.

15. Avaliação: Se as extinções das amostras estiverem além a gama linear da calibração, diluí-las novamente e repetir.

Os resultados estão apresentados na Figura 10.

Níveis cerebrais de epítopos do globulómero A (20-42) me extractos de cérebro de pacientes de DA e sujeitos de controlo

Foi usado um ELISA em sanduíche para avaliar os extractos de cérebro quanto ao seu teor de epítopos de globulómero A (20-42) truncado. Foram usados ELISA com so respectivos anticorpos contra o globulómero A (20-42 para calibração.

A extracção de tecido de cérebro com doença de Alzheimer mostra que o teor de epítopos de globulómero A (20-42) é significativamente elevado comparativamente com um paciente de controlo. Isto mostra que de facto o epítopo de globulómero A (20-42) é uma espécie de A relevante no

cérebro humano com doença de Alzheimer e não somente é relevante para modelos animais da doença de Alzheimer. Anticorpos dirigidos contra o epítopo de globulómero A (20-42) são portanto altamente desejáveis para o tratamento da doença de Alzheimer.

Exemplo 12: Desenvolvimento de linhas celulares de hibridoma anti-globulómero A (20-42)

Anticorpos monoclonais podem ser preparados usando uma ampla variedade de técnicas conhecidas na especialidade incluindo o uso das tecnologias de hibridomas, recombinante e de exibição em fagos, ou uma sua combinação. Por exemplo, anticorpos monoclonais podem ser produzidos usando técnicas de hibridomas incluindo aquelas conhecidas na técnica e ensinadas, por exemplo, em Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, *et al.*, em: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). O termo "anticorpo monoclonal" da maneira aqui usada não está limitado aos anticorpos produzidos através da tecnologia de hibridomas. O termo "anticorpo monoclonal" refere-se a um anticorpo que é derivado de um clone único, incluindo qualquer clone eucariota, procariota ou fágico, e não o método pelo qual é produzido.

O protocolo particular usado para produzir os anticorpos aqui descritos é como se segue:

Imunização de ratinhos: ratinhos Balb/c e A/J (6-8 semanas de idade) foram imunizados subcutaneamente com 50 ug de antigénio em CFA. Os animais receberam reforços a cada três semanas com 50 ug de antigénio em Immuneasy™ (Qiagen), num total de três reforços. Quatro dias antes da fusão, os ratinhos receberam intravenosamente um reforço com 10 ug de antigénio.

Fusão celular e rastreio de hibridomas: Células do baço de animais imunizados foram fundidas com células de mieloma SP2/0-Ag14 numa razão de 5:1 usando técnicas padrão. Sete a dez dias após a fusão, quando foram observadas colónias macroscópicas, os SN foram testados por ELISA quanto a anticorpo contra globulómero A (20-42). Células de

poços positivos de ELISA foram escaladas e clonadas por diluição limitante.

Determinação do isotipo do anticorpo: O isotipo dos mAb anti-globulómero A (20-42) foi determinado usando o seu kit de isotipagem Zymed EIA.

Escalamento e purificação de anticorpos monoclonais: os hibridomas foram expandidos em meio contendo soro bovino fetal baixo teor de IgG a 5%. (Hyclone). O sobrenadante foi colhido e concentrado. O mAb foi purificado usando cromatografia em Proteína A e dialisado para PBS.

Títulos séricos: Dez ratinhos foram imunizados com o globulómero A (20-42). Todos os ratinhos sero-converteram com títulos em ELISA (1/2 DO 450 nm Max) de 1: 5000-10 000.

******

DESIGNAÇÕES DE HIBRIDOMAS QUE PRODUZEM ANTICORPOS MONOCLONAIS

Designações internas de Abbott Laboratories usadas para os depósitos.

Linhas celulares depositadas:

1) ML 13-7C6.1D4.4A9.5G8 (também referido aqui como "7C6")

2) ML 15-5F7.5B10 (também referido aqui como "5F7")

3) ML 15-10F11.3D9 (também referido aqui como "10F11")

4) ML 15-4B7.3A6 (também referidos aqui como "4B7")

5) ML 15-2F2.3E12 (também referido aqui como "2F2")

6) ML 15-6A2.4B10 (também referido aqui como "6A2")

7) ML 13-4D10.3F3 (também referido aqui como "4D10")

8) ML 15-7E5.5E12 (também referido aqui como "7E5")

9) ML 15-10C1.5C6.3H4 (também referido aqui como "10C1")

10) ML 15-3B10.2D5.3F1 (também referido aqui como "3B10")

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Abbott GmbH & Co.KG Abbott Laboratories

<120> Anticorpos Anti-Globulómeros Aß, Suas Porções de Ligação ao Antigénio, Correspondentes Hibridomas, Ácidos nucleicos, Vectores, Células Hospedeiras, Métodos de Produção dos Ditos Anticorpos, Composições Compreendendo os Ditos Anticorpos, Usos dos Ditos Anticorpos e Métodos para Uso dos Ditos Anticorpos

<130> M/46385

<150> US 60/740,866
<151> 2005-11-28

<150> US 60/779,171
<151> 2006-03-03

<150> US 60/787,361
<151> 2006-03-30

<150> US 60/842,400
<151> 2006-09-05

<160> 42

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 360

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> VH ML15-5F7

<400> 1
caggtccagc tgaagcagtc tggagctgag ctggtgaggc ctgggacttc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggcta caccttcact accttctata tacactgggt gaagcagagg 120

cctggacagg gccttgagtg gattggaatg attggtcctg gaagtggtaa tacttactac 180

aatgagatgt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca catcctccag cacagcctac 240

atgcagctca gcagcctcac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagagcaaag 300

tcagctcggg cggcctggtt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctctgca 360

<210> 2
<211> 339

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> VL ML15-5F7

<400> 2
gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atcttcttgca gatctagtca gagcgttgta cagagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120

tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acaaagtttc caaccgattt 180

tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttcct 300

cccacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgg 339

<210> 3
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH ML15-5F7

<400> 3
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Phe
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Met Ile Gly Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Met Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Lys Ser Ala Arg Ala Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 4
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL ML15-5F7

<400> 4
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Val Val Gln Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 5
<211> 360
<212> ADN
<213>. Artificial
<220>
<223> VH ML15-10F11
<400> 5
caggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggata cacattcact agctatgtta tgcactgggt gaagcagagg 120
cctgggcagg gccttgagtg gattggatat atttatcctt acaatgatgg tactaagtac 180
aatgagaagt tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatcctccag cacagtatat 240
atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctacagtct attactgtac agtagagggt 300
gctacctggg acgggtactt cgatgtctgg ggcacaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

<210> 6
<211> 339
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> VL ML15-10F11
<400> 6
gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta ccattggaca atcagcctct 60

atctcttgca agtcaagtca gagcctctta tatagtaaag gaaaaaccta tttgaattgg 120

ttattacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaatct atctggtgtc taaactggac 180

tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggaa cagattttac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattactgcg tgcaaggtac acattttcct 300

cacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgg 339

<210> 7
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH ML15-10F11

<400> 7

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5				10					15		
Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		
Val	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asn	Asp	Gly	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ser	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Val	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Thr	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Thr	Val	Glu	Gly	Ala	Thr	Trp	Asp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Thr
			100					105					110		
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115					120								

<210> 8
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL ML15-10F11

<400> 8

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15

Gln Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Lys Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 9
<211> 354
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> VH ML13-7C6

<400> 9

gaagtgaagc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatgcca tgtcttgggt tcgccagact 120

ccagcgaaga ggctagagtg ggtcgcgtcc attcataata gaggtactat cttctatcta 180

gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagataatg tcaggaacac cctgtacctg 240

caaatgagca gtctgaggtc tgaggacacg gccatatatt actgtacaag aggccggagt 300

aactcctatg ctatggacta ctggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctcg 354

<210> 10
<211> 339
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> VL ML13-7C6

<400> 10
gatgttttgg tgacccaatc tccactctcc ctgcctgtca ggcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgcc gatctactca gacccttgta catcgtaatg gagacaccta tttagaatgg 120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag tccctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
tctggggtcc cagacaggtt cagcggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttccg 300
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgg 339

<210> 11
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH ML13-7C6

<400> 11
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Ala Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile His Asn Arg Gly Thr Ile Phe Tyr Leu Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Arg Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Arg Gly Arg Ser Asn Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 12
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL ML13-7C6

<400> 12

Asp Val Leu Val Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Arg Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Thr Gln Thr Leu Val His Arg
20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 13
<211> 354
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> VH ML15-4B7

<400> 13
gaggtgaagc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggaggctc ccggaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt gactacgaaa tggtgtgggt tcgacaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggttgcatac attagtagtg gcagtcgtac catctactat 180

gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atcccaagaa caccctgttc 240

ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aaggacatta 300

ctacggctac actttgacta ctggggccaa ggcaccattc tcacagtctc ctca 354

<210> 14
<211> 342
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> VL ML15-4B7

<400> 14
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctagctgtgt cagttggaga gaaggttact 60

atgagctgca ggtccagtca gagcctttta tataggagca atcaaaacaa cttcttggcc 120

tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tttactgggc atccactagg 180

gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240

atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat 300

ccgtggacgt tcggtggagg caccaagctg gaaatcaaac gg 342

<210> 15
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH ML15-4B7

<400> 15
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Glu Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Arg Thr Ile His Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Leu Leu Arg Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ile Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 16
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL ML15-4B7

<400> 16

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe Tyr Arg
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys Arg

<210> 17
<211> 360
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> VH ML15-2F2

<400> 17

caggtccagc tgaagcagtc tggagctgag ctggtgaggc ctgggacttc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggcta caccttcact agctttata tacactgggt gaagcagagg 120

cctggacagg gccttgagtg gattggaatg attggtcctg gaagtggtaa tacttactac 180

aatgagatgt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca catcctccag cacagcctac 240

atgcagctca gcagcctcac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagagcaaag 300

tcagctcggg cggcctggtt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctctgca 360

<210> 18
<211> 339
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> VL ML15-2F2

<400> 18
gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gagcgttgta cagagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120

tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acaaagtttc caaccgattt 180

tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttcct 300

cccacgttcg gaqqqqqqac caagctggaa ataaaacgg 339

<210> 19
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH ML15-2F2

<400> 19
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Phe
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Met Ile Gly Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Met Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Lys Ser Ala Arg Ala Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 20
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL ML15-2F2

<400> 20

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Val Val Gln Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 21
<211> 360
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> VH ML15-6A2

<400> 21
caggtccagc tgcagcagtc tggagctgag ctggtgaggc ctgggacctc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggcta cacattcact agcttctata tacactgggt gaggcagagg 120

cctggacagg gccttgagtg gattggaatg attggtcctg gaagtggtaa tacttactac 180

aatgagatgt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca catcctccag cacagcctac 240

atgcagctca gcagcctcac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagagcaaag 300

tcacatcggg cggcctggtt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctctgca 360

<210> 22
<211> 339
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> VL ML15-6A2

<400> 22
gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gagccgttgta cagagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120

tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acaaagtttc caaccgattt 180

tttggggtcc cagacaggtt cagtggcagt agatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttcct 300

ccccacgttcg gaggcgggac caagctggaa ataaaacgg 339

<210> 23
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH ML15-6A2

<400> 23
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Phe
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Met Ile Gly Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Met Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Lys Ser His Arg Ala Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 24
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL ML15-6A2

<400> 24

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Val Val Gln Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Phe Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 25
<211> 336
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> VH ML13-4D10

<400> 25

caggtgcagc tgaagcagtc aggacctagc ctaatacagc cctcacagag cctgtccata 60

acctgcacag tctctgggtt ctcattaact agctatggtg tacactgggt tcgccagtct 120

ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtg atatggagag gtggaaggat agactataat 180

gcagctttca tgtccagact gagcatcacc aaggacaact ccaagagcca agttttcttt 240

aaaatgaaca gtctgcaagc tgatgacact gccatatact actgtgccag aaactccgat 300

gtctggggca cagggaccac ggtcaccgtc tcctca 336

<210> 26
<211> 339
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> VL ML13-4D10

<400> 26
gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta ccattggaca accagcctcc 60

atctcttgca agtcaagtca gagcctctta gatattgatg gaaagacata tttgaattgg 120

ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaatct atctggtgtc taaactggac 180

tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcagggg cagatttcac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattattgct ggcaaggtac acattttccg 300

tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgg 339

<210> 27
<211>, 112
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH ML13-4D10

<400> 27

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Ser Leu Ile Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Arg Ile Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asn Ser Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 28
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL ML13-4D10

<400> 28

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ile
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 29
<211> 354
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> VH ML15-7E5

<400> 29

gaggtgaagc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggaggctc ccggaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt gactacgaaa tggtgtgggt tcgacaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggttgcatac attagtagtg gcagtcgtac catccactat 180

gcagacacag tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca atcccaagaa caccctgttc 240

ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aaggacatta 300

ctacggctac actttgacta ctggggccaa ggcaccattc tcacagtctc ctca 354

<210> 30
<211> 342
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> VL ML15-7E5

<400> 30
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctagctgtgt cagttggaga gaaggttact 60

atgagctgca ggtccagtca gagcctttta tataggagca atcaaaagaa cttcttggcc 120

tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tttactgggc atccactagg 180

gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240

atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat 300

ccgtggacgt tcggtggagg caccaagctg gaaatcaaac gg 342

<210> 31
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH ML15-7E5

<400> 31
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Glu Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Arg Thr Ile His Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Leu Leu Arg Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ile Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 32
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL ML15-7E5

<400> 32

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe Tyr Arg
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys Arg

<210> 33
<211> 354
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> VH ML15-10C1

<400> 33
gaggtgaagc tggtggagtc tgggggaggt ttagtgcagc ctggaggctc ccggaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt gactacgaaa tgggtgtggt tcgacaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggttgcatac attaatagtg gcagtggtac catctactat 180

gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atcccaagaa caccctgttc 240

ctgcaaatga gcagtctaag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aaggacatta 300

ctacggctac actttgacta ctggggccaa ggcaccattc tcacagtctc ctca 354

<210> 34
<211> 342
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> VL ML15-10C1

<400> 34
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctagctgtgt cagttggaga gaaggttact 60

atgagctgca agtccagtca gagcctttta tatagtcgca atcaaaagaa ctttttggcc 120

tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tttactgggc atccactggg 180

gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240

atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttttagctat 300

ccgtggacgt tcggtggagg caccaagctg gaaatcaaac gg 342

<210> 35
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH ML15-10C1

<400> 35
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Asn Ser Gly Ser Gly Thr Ile His Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Leu Leu Arg Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ile Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 36
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VL ML15-10C1

<400> 36

```
Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Tyr Ser
            20                  25                  30

Arg Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
        35                  40                  45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Gly Glu Ser Gly Val
    50                  55                  60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65                  70                  75                  80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
                85                  90                  95

Tyr Phe Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
            100                 105                 110

Lys Arg
```

<210> 37
<211> 360
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> VH ML15-3B10

<400> 37

```
caggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg     60

tcctgcaagg cttctggata cacattcact gactatgtta tacactgggt gaagcagaag    120

cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg tactcagtac    180

aatgagaagt tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatcctccag cacagtctac    240

atggagctca gcagtctgac ctctgaggac tctacagtct actactgtac agtagagggt    300

ggtacctggg acgggtattt cgatgtctgg ggcacaggga ccacggtcac cgtctcctca    360
```

<210> 38
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> VH ML15-3B10

<400> 38

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1               5                  10                  15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
            20                  25                  30

Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Gln Tyr Asn Glu Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Thr Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Val Glu Gly Gly Thr Trp Asp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr
            100                 105                 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 39
<211> 330
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> região constante gama-1 de Ig

<400> 39

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                  10                  15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45
```

```
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240

Met Thr Lys Asn Glu Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Gln Asn
            260                 265                 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                 330
```

<210> 40
<211> 330
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> região constante gama-1 de Ig mutante

<400> 40

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                  10                  15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175
```

```
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                 330
```

<210> 41
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> região constante capa de Ig

<400> 41

```
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1               5                  10                  15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
            20                  25                  30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
        35                  40                  45
```

```
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50                  55                  60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65                  70                  75                  80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
                85                  90                  95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
            100                 105
```

<210> 42
<211> 105
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> região constante lambda de Ig

<400> 42

```
Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1               5                   10                  15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
            20                  25                  30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
        35                  40                  45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
    50                  55                  60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
65                  70                  75                  80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
                85                  90                  95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
            100                 105
```

Lisboa, 2014.12.03

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal possuindo uma afinidade de ligação para com um globulómero A (20-42) que é pelo menos 10 vezes superior à afinidade de ligação do anticorpo para com um globulómero A (1-42).

2. Anticorpo da reivindicação 1, em que a afinidade de ligação do anticorpo para com globulómero A (20-42) é pelo menos 100, pelo menos 1000, pelo menos 10 000, ou pelo menos 100 000 vezes superior à afinidade de ligação do anticorpo para como globulómero A (1-42).

3. Anticorpo da reivindicação 1 ou 2, em que o anticorpo se liga ao globulómero A (20-42) com uma K_D de $1x10^{-7}$ M ou maior afinidade, com uma K_D de $1x10^{-8}$ M ou maior afinidade, com uma K_D de $1x10^{-9}$ M ou maior afinidade, com uma K_D de $1x10^{-10}$M ou maior afinidade, ou com uma K_D de $1x10^{-11}$ M ou maior afinidade.

4. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que a afinidade de ligação do anticorpo para com o globulómero A (20-42) é superior à afinidade de ligação do anticorpo para com um globulómero A (1-42).

5. Anticorpo da reivindicação 4, em que a afinidade de ligação do anticorpo para com o globulómero A (20-42) é pelo menos 10, pelo menos 100, pelo menos 1000, pelo menos 10 000, ou pelo menos 100 000 vezes superior à afinidade de ligação do anticorpo para com o globulómero A (12-42).

6. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que a afinidade de ligação do anticorpo para com o globulómero A (20-42) é pelo menos 10, pelo menos 100, pelo menos 1000, pelo menos 10 000, ou pelo menos 100 000 vezes superior à afinidade de ligação para com um monómero A (1-42).

7. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que o anticorpo se liga ao monómero A (1-42) com uma K_D de $1x10^{-8}$ M ou menor afinidade, com uma K_D de $1x10^{-7}$ M ou menor afinidade, com uma K_D de $1x10^{-6}$ M ou menor afinidade, ou com uma K_D de $1x10^{-5}$ M ou menor afinidade.

8. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que a afinidade de ligação do anticorpo para com o globulómero $A_{(20-42)}$ é pelo menos 10, pelo menos 100, pelo menos 1000, pelo menos 10 000, ou pelo menos 100 000 vezes superior à afinidade de ligação do anticorpo para com um monómero $A_{(1-40)}$.

9. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que o anticorpo se liga ao monómero $A_{(1-40)}$ com uma K_D de $1x10^{-8}$ M ou menor afinidade, com uma K_D de $1x10^{-7}$ M ou menor afinidade, com uma K_D de $1x10^{-6}$ M ou menor afinidade, ou com uma K_D de $1x10^{-5}$ M ou menor afinidade.

10. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que a afinidade de ligação do anticorpo para com o globulómero $A_{(20-42)}$ é pelo menos 10, pelo menos 100, pelo menos 1000, pelo menos 10 000, ou pelo menos 100 000 vezes superior à afinidade de ligação do anticorpo para com fibrilhas de $A_{(1-42)}$.

11. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que o anticorpo se liga a fibrilhas de $A_{(1-42)}$ com uma K_D de $1x10^{-8}$ M ou menor afinidade, com uma K_D de $1x10^{-7}$M ou menor afinidade, com uma K_D de $1x10^{-6}$ M ou menor afinidade, ou com uma K_D de $1x10^{-5}$ M ou menor afinidade.

12. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 11, em que a afinidade de ligação do anticorpo para com o globulómero $A_{(20-42)}$ é pelo menos 10, pelo menos 100, pelo menos 1000, pelo menos 10 000, ou pelo menos 100 000 vezes superior à afinidade de ligação do anticorpo para com fibrilhas de $A_{(1-40)}$.

13. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 12, em que o anticorpo se liga a fibrilhas de $A_{(1-40)}$ com uma K_D de $1x10^{-8}$ M ou menor afinidade, com uma K_D de $1x10^{-7}$M ou menor afinidade, com uma K_D de $1x10^{-6}$ M ou menor afinidade, ou com uma K_D de $1x10^{-5}$ M ou menor afinidade.

14. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 13, em que o anticorpo é um anticorpo recombinante.

15. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 14, em que o anticorpo é humano ou humanizado.

16. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 15, em que o referido anticorpo se liga ao mesmo epítopo que um anticorpo monoclonal seleccionado do grupo que consiste em, o anticorpo monoclonal 5F7 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7241 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 10F11 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7239 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 7C6 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7240 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 4B7 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7242 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 2F2 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7408 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 6A2 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7409 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 4D10 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7405 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 7E5 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7809 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 10C1 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7810 na American Type Culture Collection, e o anticorpo monoclonal 3B10 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7851 na American Type Culture Collection.

17. Anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 16, em que o anticorpo compreende a sequência de aminoácidos da CDR3 da cadeia pesada e/ou a sequência de aminoácidos da CDR3 da cadeia leve de um anticorpo monoclonal seleccionado do grupo que consiste em, o anticorpo monoclonal 5F7 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7241 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 10F11 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7239 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 7C6 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7240 na

American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 4B7 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7242 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 2F2 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7408 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 6A2 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7409 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 4D10 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7405 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 7E5 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7809 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 10C1 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7810 na American Type Culture Collection, e o anticorpo monoclonal 3B10 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7851 na American Type Culture Collection.

18. Anticorpo da reivindicação 17, em que o anticorpo compreende a sequência de aminoácidos da CDR2 da cadeia pesada e/ou a sequência de aminoácidos da CDR2 da cadeia leve de um anticorpo monoclonal seleccionado do grupo que consiste em, o anticorpo monoclonal 5F7 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7241 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 10F11 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7239 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 7C6 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7240 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 4B7 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7242 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 2F2 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7408 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 6A2 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7409 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 4D10 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7405 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 7E5 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7809 na American Type Culture

Collection, o anticorpo monoclonal 10C1 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7810 na American Type Culture Collection, e o anticorpo monoclonal 3B10 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7851 na American Type Culture Collection.

19. Anticorpo da reivindicação 17 ou 18, em que o anticorpo compreende a sequência de aminoácidos da CDR1 da cadeia pesada e/ou a sequência de aminoácidos da CDR1 da cadeia leve de um anticorpo monoclonal seleccionado do grupo que consiste em, o anticorpo monoclonal 5F7 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7241 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 10F11 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7239 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 7C6 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7240 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 4B7 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7242 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 2F2 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7408 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 6A2 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7409 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 4D10 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7405 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 7E5 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7809 na American Type Culture Collection, o anticorpo monoclonal 10C1 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7810 na American Type Culture Collection, e o anticorpo monoclonal 3B10 obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7851 na American Type Culture Collection.

20. Anticorpo da reivindicação 1 em que o anticorpo compreende pelo menos uma CDR compreendendo uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo que consiste em: resíduos de aminoácido 31-35 de SEQ ID NO:3, resíduos de aminoácido 50-66 de SEQ ID NO:3, resíduos de aminoácido 99-109 de SEQ ID NO:3, resíduos de aminoácido 24-39 de SEQ ID NO:4, resíduos de

aminoácido 55-61 de SEQ ID NO:4, resíduos de aminoácido 94-102 de SEQ ID NO:4, resíduos de aminoácido 31-35 de SEQ ID NO:7, resíduos de aminoácido 50-66 de SEQ ID NO:7, resíduos de aminoácido 97-109 de SEQ ID NO:7, resíduos de aminoácido 24-39 de SEQ ID NO:8, resíduos de aminoácido 55-61 de SEQ ID NO:8, resíduos de aminoácido 94-102 de SEQ ID NO:8, resíduos de aminoácido 31-35 de SEQ ID NO:11, resíduos de aminoácido 50-65 de SEQ ID NO:11, resíduos de aminoácido 98-107 de SEQ ID NO:11, resíduos de aminoácido 24-39 de SEQ ID NO:12, resíduos de aminoácido 55-61 de SEQ ID NO:12, resíduos de aminoácido 94-102 de SEQ ID NO:12, resíduos de aminoácido 31-35 de SEQ ID NO:15, resíduos de aminoácido 50-66 de SEQ ID NO:15, resíduos de aminoácido 99-107 de SEQ ID NO:15, resíduos de aminoácido 24-40 de SEQ ID NO:16, resíduos de aminoácido 56-62 de SEQ ID NO:16, resíduos de aminoácido 95-103 de SEQ ID NO:16, resíduos de aminoácido 31-35 de SEQ ID NO:19, resíduos de aminoácido 50-66 de SEQ ID NO:19, resíduos de aminoácido 99-109 de SEQ ID NO:19, resíduos de aminoácido 24-39 de SEQ ID NO:20, resíduos de aminoácido 55-61 de SEQ ID NO:20, resíduos de aminoácido 94-102 de SEQ ID NO:20, resíduos de aminoácido 31-35 de SEQ ID NO:23, resíduos de aminoácido 50-66 de SEQ ID NO:23, resíduos de aminoácido 99-109 de SEQ ID NO:23, resíduos de aminoácido 24-39 de SEQ ID NO:24, resíduos de aminoácido 55-61 de SEQ ID NO:24, resíduos de aminoácido 94-102 de SEQ ID NO:24, resíduos de aminoácido 31-35 de SEQ ID NO:27, resíduos de aminoácido 50-65 de SEQ ID NO:27, resíduos de aminoácido 98-101 de SEQ ID NO:27, resíduos de aminoácido 24-39 de SEQ ID NO:28, resíduos de aminoácido 55-61 de SEQ ID NO:28, resíduos de aminoácido 94-102 de SEQ ID NO:28, resíduos de aminoácido 31-35 de SEQ ID NO:31, resíduos de aminoácido 50-66 de SEQ ID NO:31, resíduos de aminoácido 99-107 de SEQ ID NO:31, resíduos de aminoácido 24-40 de SEQ ID NO:32, resíduos de aminoácido 56-62 de SEQ ID NO:32, resíduos de aminoácido 95-103 de SEQ ID NO:32, resíduos de aminoácido 31-35 de SEQ ID NO:35, resíduos de aminoácido 50-66 de SEQ ID NO:35, resíduos de aminoácido 99-107 de SEQ ID NO:35, resíduos de aminoácido 24-40 de SEQ ID NO:36, resíduos de aminoácido 56-62 de SEQ ID NO:36, resíduos de aminoácido 95-103 de SEQ ID NO:36, resíduos de aminoácido 31-35 de SEQ ID NO:38, resíduos de aminoácido 50-66 de SEQ ID NO:38, e resíduos de aminoácido 98-109 de SEQ ID NO:38.

21. Anticorpo da reivindicação 20 em que o anticorpo compreende pelo menos 3 CDR seleccionadas entre um conjunto de CDR do domínio variável que consiste em:

Conjunto de CDR de VH 5F7	
VH 5F7 CDR-H1	TFYIH: resíduos 31-35 de SEQ ID NO:3
VH 5F7 CDR-H2	MIGPGSGNTYYNEMFKD: resíduos 50-66 de SEQ ID NO:3
VH 5F7 CDR-H3	AKSARAAWFAY: resíduos 99-109 de SEQ ID NO:3
Conjunto de CDR de VL 5F7	
VL 5F7 CDR-L1	RSSQSVVQSNGNTYLE: resíduos 24-39 de SEQ ID NO:4
VL 5F7 CDR-L2	KVSNRFS: resíduos 55-61 de SEQ ID NO:4
VL 5F7 CDR-L3	FQGSHVPPT: resíduos 94-102 de SEQ ID NO:4
Conjunto de CDR de VH 10F11	
VH 10F11 CDR-H1	SYVMH: resíduos 31-35 de SEQ ID NO:7
VH 10F11 CDR-H2	YIYPYNDGTKYNEKFKG: resíduos 50-66 de SEQ ID NO:7
VH 10F11 CDR-H3	TVEGATWDGYFDV: resíduos 97-109 de SEQ ID NO:7
Conjunto de CDR de VL 10F11	
VL 10F11 CDR-L1	KSSQSLLYSKGKTYLN: resíduos 24-39 de SEQ ID NO:8
VL 10F11 CDR-L2	LVSKLDS: resíduos 55-61 de SEQ ID NO:8
VL 10F11 CDR-L3	VQGTHFPHT: resíduos 94-102 de SEQ ID NO:8

Conjunto de CDR de VH 7C6	
VH 7C6 CDR-H1	SYAMS: resíduos 31-35 de SEQ ID NO:11
VH 7C6 CDR-H2	SIHNRGTIFYLDSVKG: resíduos 50-65 de SEQ ID NO:11
VH 7C6 CDR-H3	GRSNSYAMDY: resíduos 98-107 de SEQ ID NO:11
Conjunto de CDR de VL 7C6	
VL 7C6 CDR-L1	RSTQTLVHRNGDTYLE: resíduos 24-39 de SEQ ID NO:12
VL 7C6 CDR-L2	KVSNRFS: resíduos 55-61 de SEQ ID NO:12
VL 7C6 CDR-L3	FQGSHVPYT: resíduos 94-102 de SEQ ID NO:12
Conjunto de CDR de VH 4B7	
VH 4B7 CDR-H1	DYEMV: resíduos 31-35 de SEQ ID NO:15
VH 4B7 CDR-H2	YISSGSRTIHYADTVKG: resíduos 50-66 de SEQ ID NO:15
VH 4B7 CDR-H3	TLLRLHFDY: resíduos 99-107 de SEQ ID NO:15
Conjunto de CDR de VL 4B7	
VL 4B7 CDR-L1	RSSQSLFYRSNQKNFLA: resíduos 24-40 de SEQ ID NO:16
VL 4B7 CDR-L2	WASTRES: resíduos 56-62 de SEQ ID NO:16
VL 4B7 CDR-L3	QQYYSYPWT: resíduos 95-103 de SEQ ID NO:16
Conjunto de CDR de VH 2F2	
VH 2F2 CDR-H1	TFYIH: resíduos 31-35 de SEQ ID NO:19
VH 2F2 CDR-H2	MIGPGSGNTYYNEMFKD: resíduos 50-66 de SEQ ID NO:19
VH 2F2 CDR-H3	AKSARAAWFAY: resíduos 99-109 de SEQ ID NO:19

Conjunto de CDR de VL 2F2	
VL 2F2 CDR-L1	RSSQSVVQSNGNTYLE: resíduos 24-39 de SEQ ID NO:20
VL 2F2 CDR-L2	KVSNRFS: resíduos 55-61 de SEQ ID NO:20
VL 2F2 CDR-L3	FQGSHVPPT: resíduos 94-102 de SEQ ID NO:20
Conjunto de CDR de VH 6A2	
VH 6A2 CDR-H1	TFYIH: resíduos 31-35 de SEQ ID NO:23
VH 6A2 CDR-H2	MIGPGSGNTYYNEMFKD: resíduos 50-66 de SEQ ID NO:23
VH 6A2 CDR-H3	AKSHRAAWFAY: resíduos 99-109 de SEQ ID NO:23
Conjunto de CDR de VL 6A2	
VL 6A2 CDR-L1	RSSQSVVQSNGNTYLE: resíduos 24-39 de SEQ ID NO:24
VL 6A2 CDR-L2	KVSNRFF: resíduos 55-61 de SEQ ID NO:24
VL 6A2 CDR-L3	FQGSHVPPT: resíduos 94-102 de SEQ ID NO:24
Conjunto de CDR de VH 4D10	
VH 4D10 CDR-H1	SYGVH: resíduos 31-35 de SEQ ID NO:27
VH 4D10 CDR-H2	VIWRGGRIDYNAAFMS: resíduos 50-65 de SEQ ID NO:27
VH 4D10 CDR-H3	NSDV: resíduos 98-101 de SEQ ID NO:27
Conjunto de CDR de VL 4D10	
VL 4D10 CDR-L1	KSSQSLLDIDGKTYLN: resíduos 24-39 de SEQ ID NO:28
VL 4D10 CDR-L2	LVSKLDS: resíduos 55-61 de SEQ ID NO:28
VL 4D10 CDR-L3	WQGTHFPYT: resíduos 94-102 de SEQ ID NO:28

Conjunto de CDR de VH 7E5	
VH 7E5 CDR-H1	DYEMV: resíduos 31-35 de SEQ ID NO:31
VH 7E5 CDR-H2	YISSGSRTIHYADTVKG: resíduos 50-66 de SEQ ID NO:31
VH 7E5 CDR-H3	TLLRLHFDY: resíduos 99-107 de SEQ ID NO:31
Conjunto de CDR de VL 7E5	
VL 7E5 CDR-L1	RSSQSLFYRSNQKNFLA: resíduos 24-40 de SEQ ID NO:32
VL 7E5 CDR-L2	WASTRES: resíduos 56-62 de SEQ ID NO:32
VL 7E5 CDR-L3	QQYYSYPWT: resíduos 95-103 de SEQ ID NO:32
Conjunto de CDR de VH 10C1	
VH 10C1 CDR-H1	DYEMV: resíduos 31-35 de SEQ ID NO:35
VH 10C1 CDR-H2	YINSGSGTIHYADTVKG: resíduos 50-66 de SEQ ID NO:35
VH 10C1 CDR-H3	TLLRLHFDY: resíduos 99-107 de SEQ ID NO:35
Conjunto de CDR de VL 10C1	
VL 10C1 CDR-L1	KSSQSLFYSRNQKNFLA: resíduos 24-40 de SEQ ID NO:36
VL 10C1 CDR-L2	WASTGES: resíduos 56-62 de SEQ ID NO:36
VL 10C1 CDR-L3	QQYFSYPWT: resíduos 95-103 de SEQ ID NO:36
Conjunto de CDR de VH 3B10	
VH 3B10 CDR-H1	DYVIH: resíduos 31-35 de SEQ ID NO:38
VH 3B10 CDR-H2	YINPYNDGTQYNEKFKG: resíduos 50-66 de SEQ ID NO:38
VH 3B10 CDR-H3	VEGGTWDGYFDV: resíduos 98-109 de SEQ ID NO:38

22. Anticorpo da reivindicação 1 em que o anticorpo compreende pelo menos um domínio variável possuindo uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo que consiste em: SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, e SEQ ID NO:38.

23. Anticorpo da reivindicação 22 compreendendo dois domínios variáveis, em que os referidos dois domínios variáveis possuem sequências de aminoácidos seleccionadas do grupo que consiste em: SEQ ID NO:3 & SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7 & SEQ ID NO:8 & SEQ ID NO:11 & SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:15 & SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:19 & SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:23 & SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:27 & SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:31 & SEQ ID NO:32 e SEQ ID NO:35 & SEQ ID NO:36.

24. Anticorpo da reivindicação 1, que é seleccionado entre:

Anticorpo monoclonal (5F7) obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7241 na American Type Culture Collection;

Anticorpo monoclonal (10F11) obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7239 na American Type Culture Collection;

Anticorpo monoclonal (7C6) obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7240 na American Type Culture Collection;

Anticorpo monoclonal (4B7) obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7242 na American Type Culture Collection;

Anticorpo monoclonal (2F2) obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7408 na American Type Culture Collection;

Anticorpo monoclonal (6A2) obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7409 na American Type Culture Collection;

Anticorpo monoclonal (4D10) obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7405 na American Type Culture Collection;

Anticorpo monoclonal (7E5) obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7809 na American Type Culture Collection;

Anticorpo monoclonal (10C1) obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7810 na American Type Culture Collection; e

Anticorpo monoclonal (3B10) obtenível a partir de um hibridoma designado pelo número de depósito PTA-7851 na American Type Culture Collection.

25. Porção de ligação ao antigénio de um anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 24.

26. Ácido nucleico isolado que codifica uma sequência de aminoácidos de um anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1-25.

27. Vector compreendendo um ácido nucleico isolado da reivindicação 26.

28. Célula hospedeira compreendendo um vector da reivindicação 27.

29. Célula hospedeira da reivindicação 28, que é um hibridoma designado por um número de depósito na American Type Culture Collection seleccionado do grupo que consiste em PTA-7241, PTA-7239, PTA-7240, PTA-7242, PTA-7408, PTA-7409, PTA-7405, PTA-7809, PTA-7810 e PTA-7851.

30. Método de produção de um anticorpo monoclonal, compreendendo a cultura de uma célula hospedeira da reivindicação 28 ou de um hibridoma da reivindicação 29 num meio de cultura sob condições adequadas para produzir o anticorpo.

31. Anticorpo monoclonal obtenível por um método da reivindicação 30.

32. Composição farmacêutica compreendendo um anticorpo ou uma porção de ligação ao antigénio como definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 25 ou 31 e um transportador farmaceuticamente aceitável.

33. Uso de um anticorpo ou de uma porção de ligação ao antigénio como definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 25 ou 31 para a preparação de uma composição farmacêutica para tratamento ou prevenção de uma amiloidose.

34. Uso de um anticorpo ou de uma porção de ligação ao antigénio como definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 25 ou 31 para a preparação de uma composição para diagnóstico de uma amiloidose tal como a doença de Alzheimer ou a síndrome de Down.

35. Método de diagnóstico de uma amiloidose que compreende proporcionar uma amostra de um indivíduo que se suspeita ter a amiloidose, tal como doença de Alzheimer ou síndrome de Down, colocar a amostra em contacto com um anticorpo ou uma porção de ligação ao antigénio como definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 25 ou 31 e detectar a formação de um complexo compreendendo o anticorpo ou a porção de ligação ao antigénio, com um antigénio, a presença do complexo indicando uma amiloidose no indivíduo.

Lisboa, 2014.12.03

FIG. 1

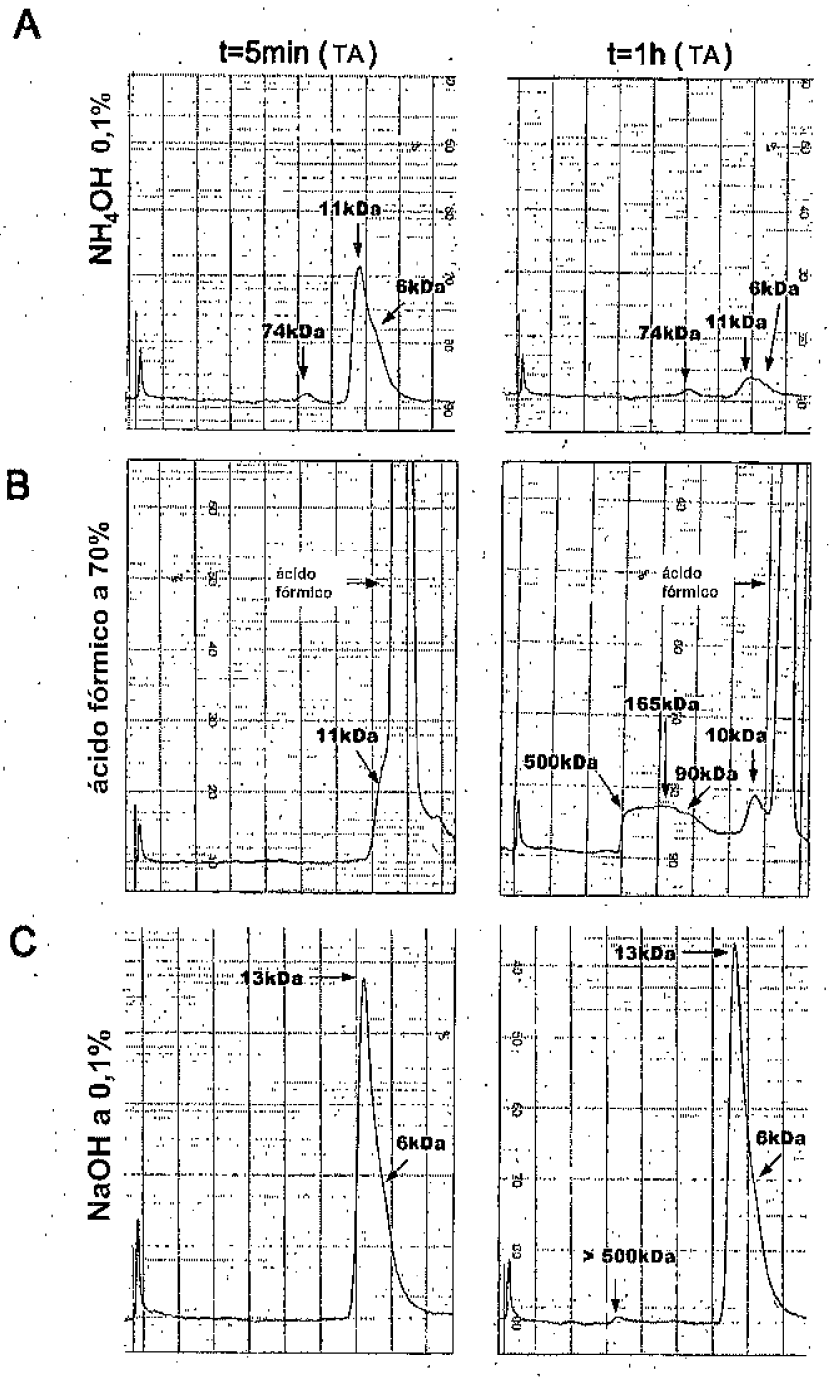

A
t=5min (TA)
t=1h (TA)
NH4OH 0,1%
11kDa
6kDa
74kDa
74kDa
11kDa
6kDa
B
ácido fórmico a 70%
ácido fórmico
11kDa
ácido fórmico
165kDa
10kDa
500kDa
90kDa
C
NaOH a 0,1%
13kDa
6kDa
13kDa
6kDa
> 500kDa

FIG. 1

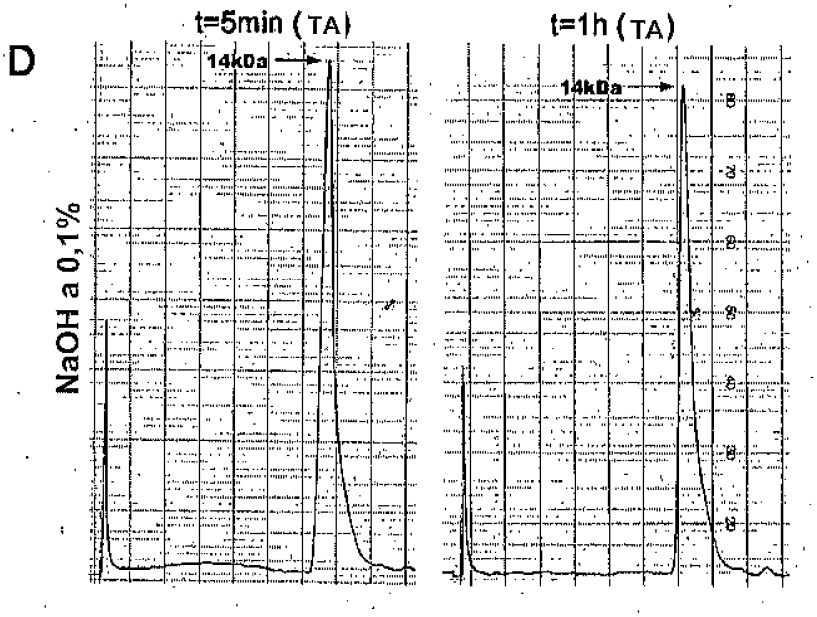
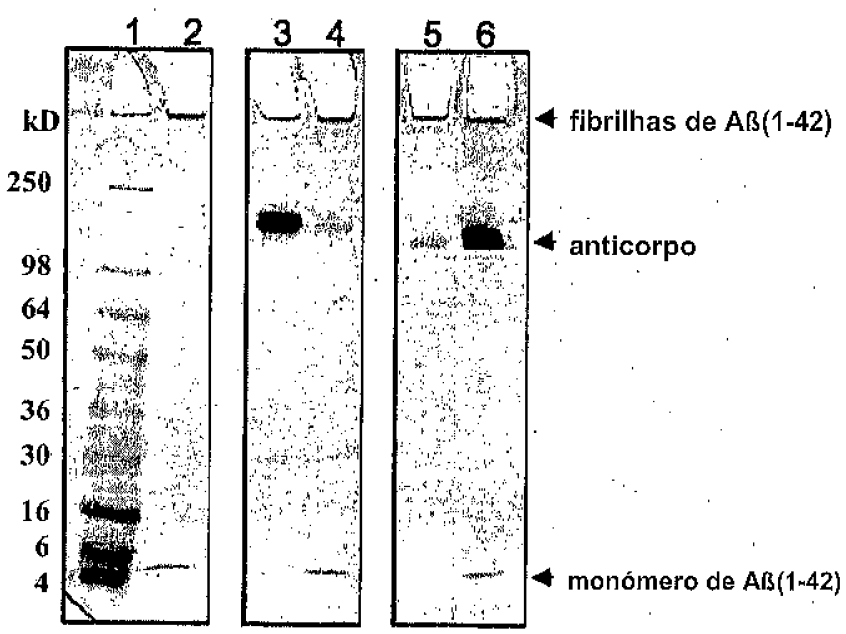


FIG. 2

A



B

	anticorpo ligado a fibrilas [%]
6E10	98
5F7	7
2F2	15
6A2	22
4D10	6
10F11	7
3B10	5
7C6	2
7E5	3
10C1	5

FIG. 3

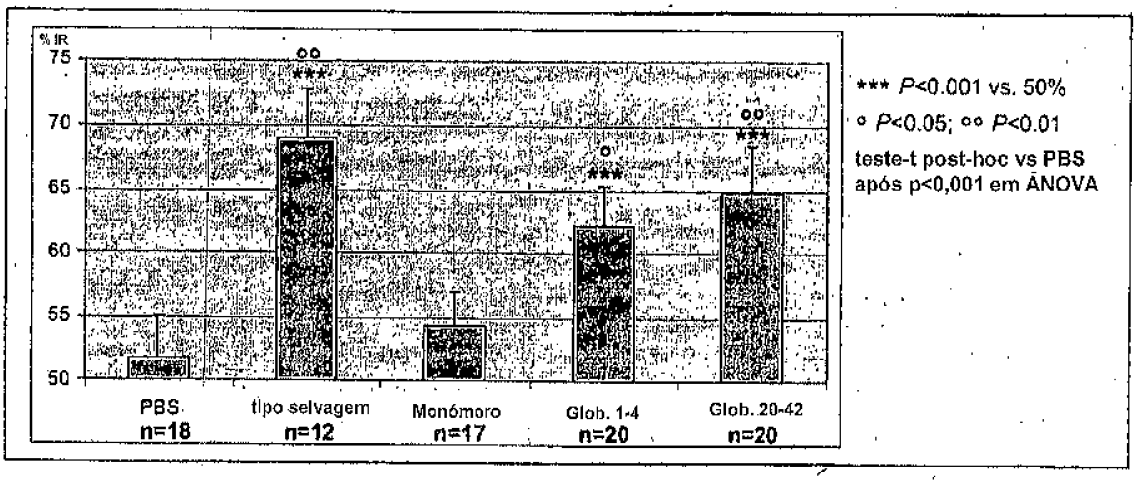

% IR
75
70
65
60
55
50
PBS
n=18
tipo selvagem
n=12
Monómoro
n=17
Glob. 1-4
n=20
Glob. 20-42
n=20
*** P<0.001 vs. 50%
° P<0.05; °° P<0.01
teste-t post-hoc vs PBS
após p<0,001 em ANOVA

FIG. 4

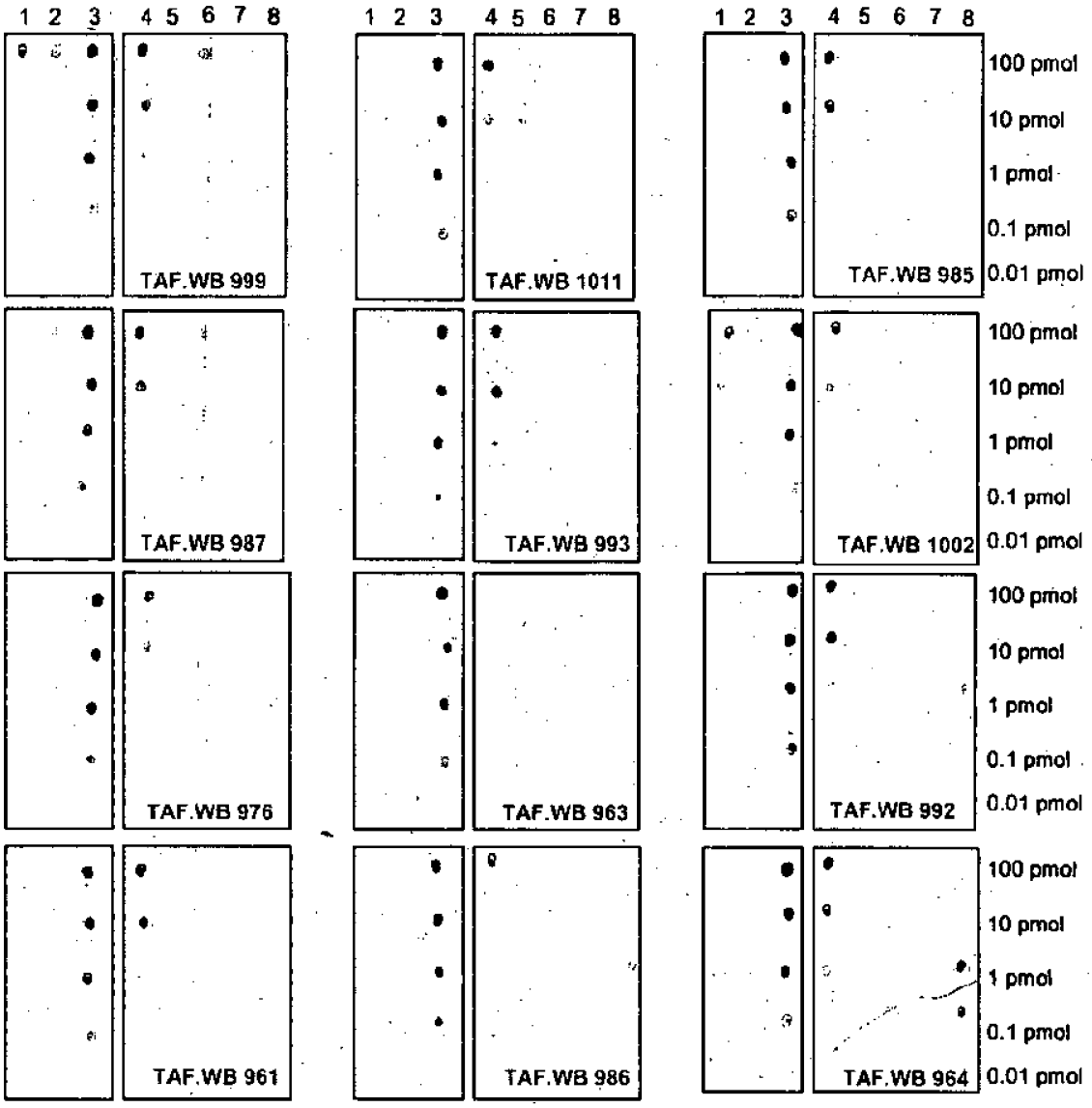

1 2 3 4 5 6 7 8
TAF.WB 999
TAF.WB 1011
TAF.WB 985
TAF.WB 987
TAF.WB 993
TAF.WB 1002
TAF.WB 976
TAF.WB 963
TAF.WB 992
TAF.WB 961
TAF.WB 986
TAF.WB 964
100 pmol
10 pmol
1 pmol
0.1 pmol
0.01 pmol

FIG. 5

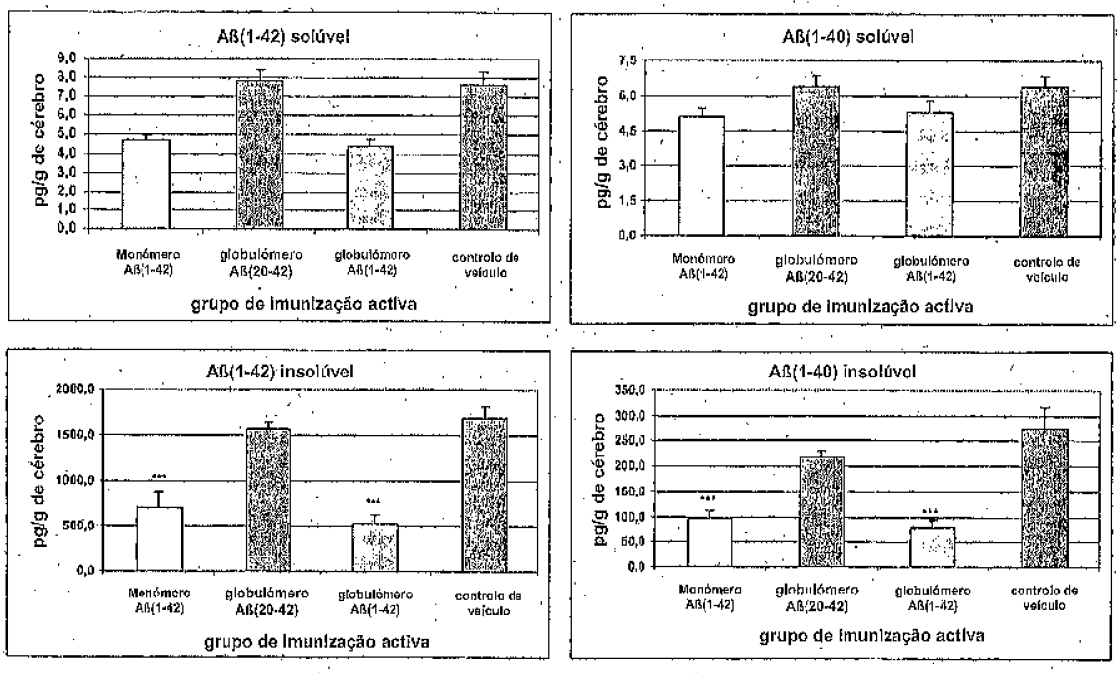

Aß(1-42) solúvel
pg/g de cérebro
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
Monómero Aß(1-42)
globulómero Aß(20-42)
globulómero Aß(1-42)
controlo de veículo
grupo de imunização activa
Aß(1-40) solúvel
pg/g de cérebro
7,5
6,0
4,5
3,0
1,5
0,0
Monómero Aß(1-42)
globulómero Aß(20-42)
globulómero Aß(1-42)
controlo de veículo
grupo de imunização activa
Aß(1-42) insolúvel
pg/g de cérebro
2000,0
1500,0
1000,0
500,0
0,0
Monómero Aß(1-42)
globulómero Aß(20-42)
globulómero Aß(1-42)
controlo de veículo
grupo de imunização activa
Aß(1-40) insolúvel
pg/g de cérebro
350,0
300,0
250,0
200,0
150,0
100,0
50,0
0,0
Monómero Aß(1-42)
globulómero Aß(20-42)
globulómero Aß(1-42)
controlo de veículo
grupo de imunização activa

FIG. 6

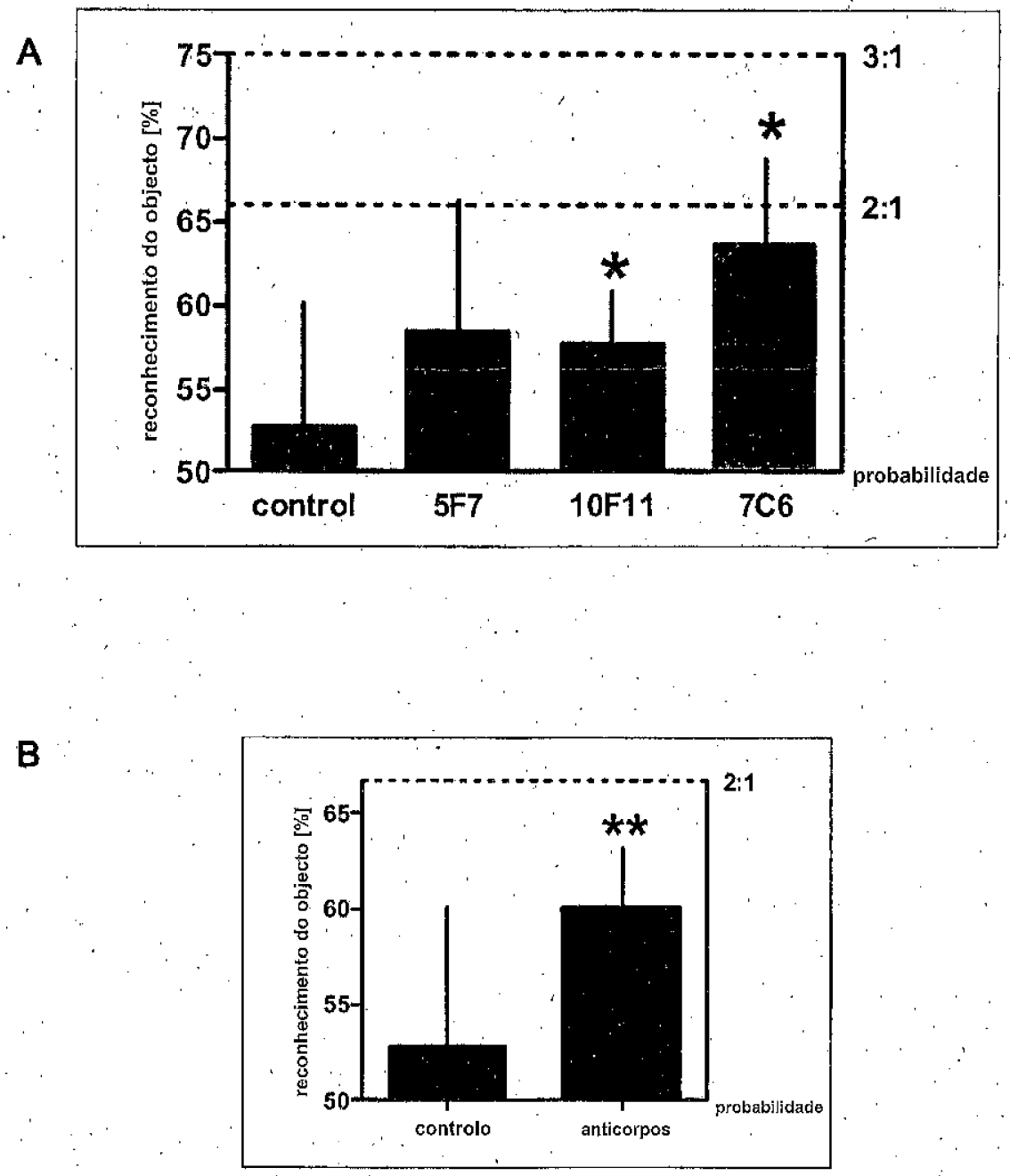
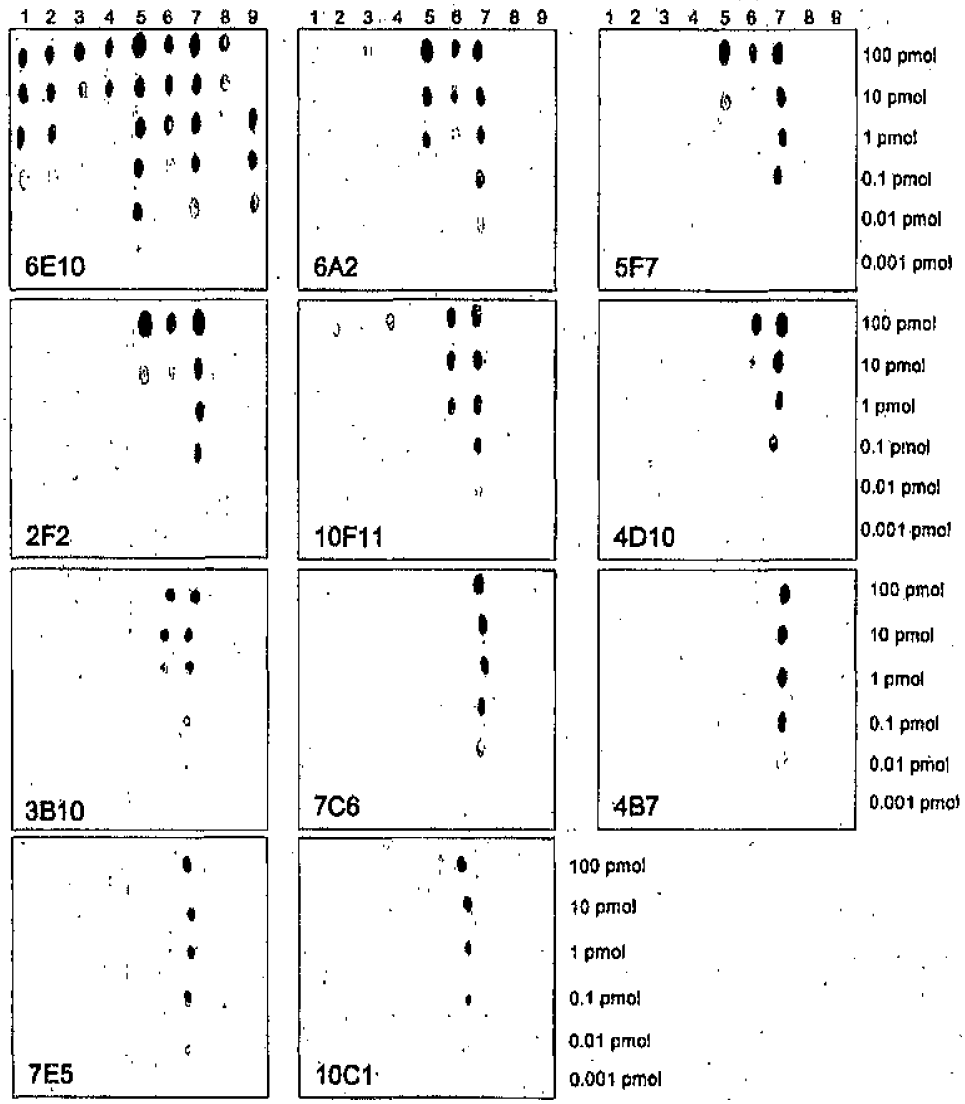

A
75
70
65
60
55
50
reconhecimento do objecto [%]
3:1
2:1
*
*
probabilidade
control
5F7
10F11
7C6
B
2:1
**
65
60
55
50
reconhecimento do objecto [%]
probabilidade
controlo
anticorpos

FIG. 7

A



B

	monómero Aβ(1-42) NH_4OH a 0,1%	monómero Aβ(1-40) NH_4OH a 0,1%	monómero Aβ(1-42) NaOH a 0,1%	monómero Aβ(1-40) NaOH a 0,1%	globulómero Aβ(1-42)	globulómero Aβ(12-42)	globulómero Aβ(20-42)	fibrilho de Aβ(1-42)	sAPPα
6E10	10	17	905	322	0,2	9	1	510	0,3
6A2	7 840	5 078	7 717	36 583	47	138	1	337 931	> 1 000
5F7	26 855	> 10 000	23 455	164 182	226	242	1	> 10 000	> 100
2F2	36 827	> 10 000	> 10 000	> 10 000	195	274	1	> 10 000	> 100
10F11	83 267	3 719	17 417	2 233	77 985	12	1	294 366	> 1 000
4D10	> 10 000	43 535	> 10 000	35 069	> 10 000	29	1	> 10 000	> 100
3B10	16 364	22 500	45 000	> 10 000	30 000	14	1	> 10 000	> 100
7C6	> 100 000	> 100 000	> 100 000	> 100 000	94 052	> 100 000	1	> 100 000	> 1 000
4B7	> 100 000	> 457 971	> 100 000	> 100 000	> 100 000	> 100 000	1	> 100 000	> 1 000
7E5	> 100 000	> 100 000	> 100 000	> 100 000	> 100 000	> 100 000	1	> 100 000	> 1 000
10C1	> 100 000	> 100 000	> 100 000	> 100 000	40 000	> 100 000	1	> 100 000	> 1 000

FIG. 8

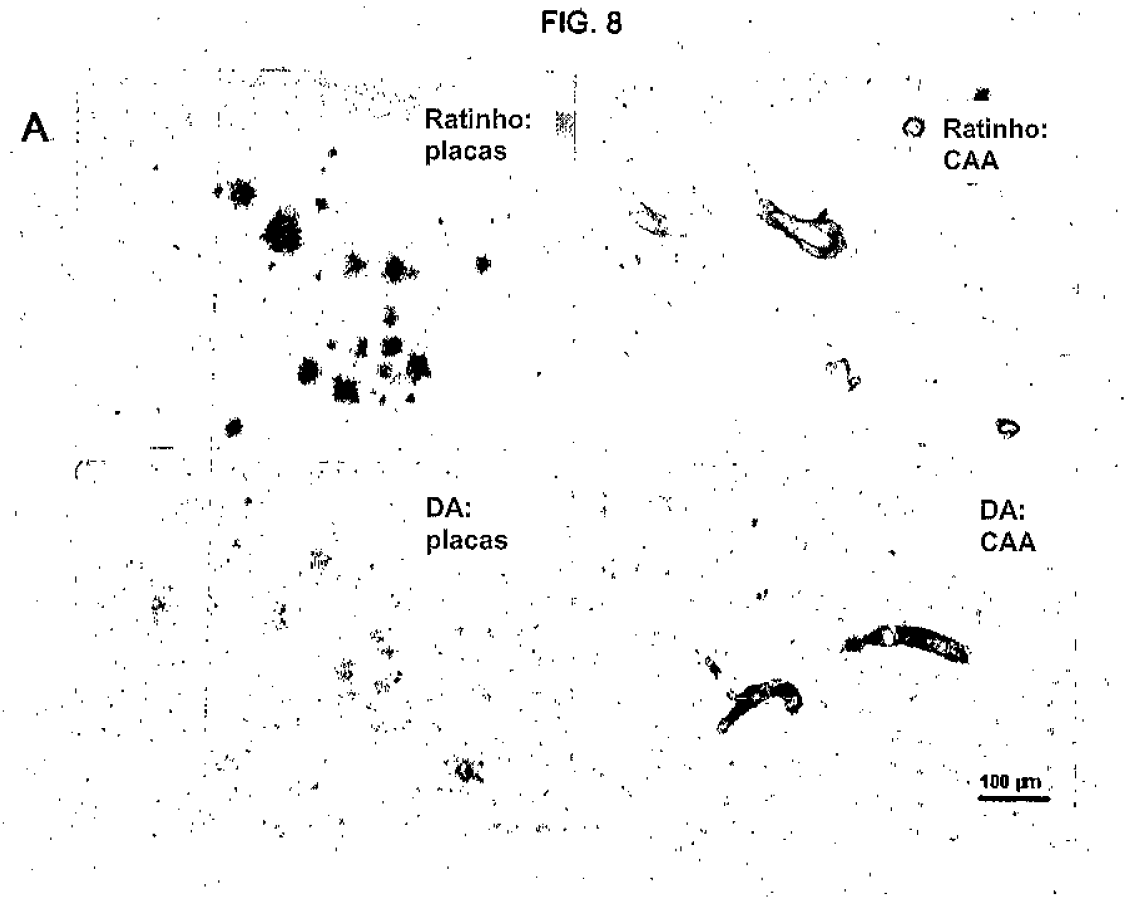


FIG. 8

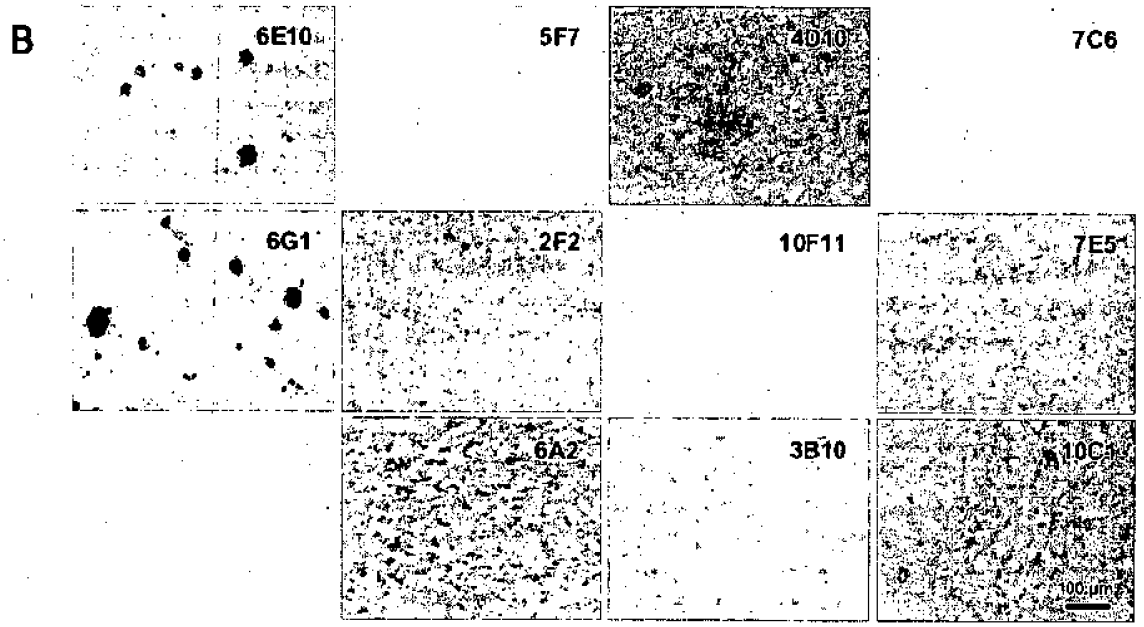


FIG. 8

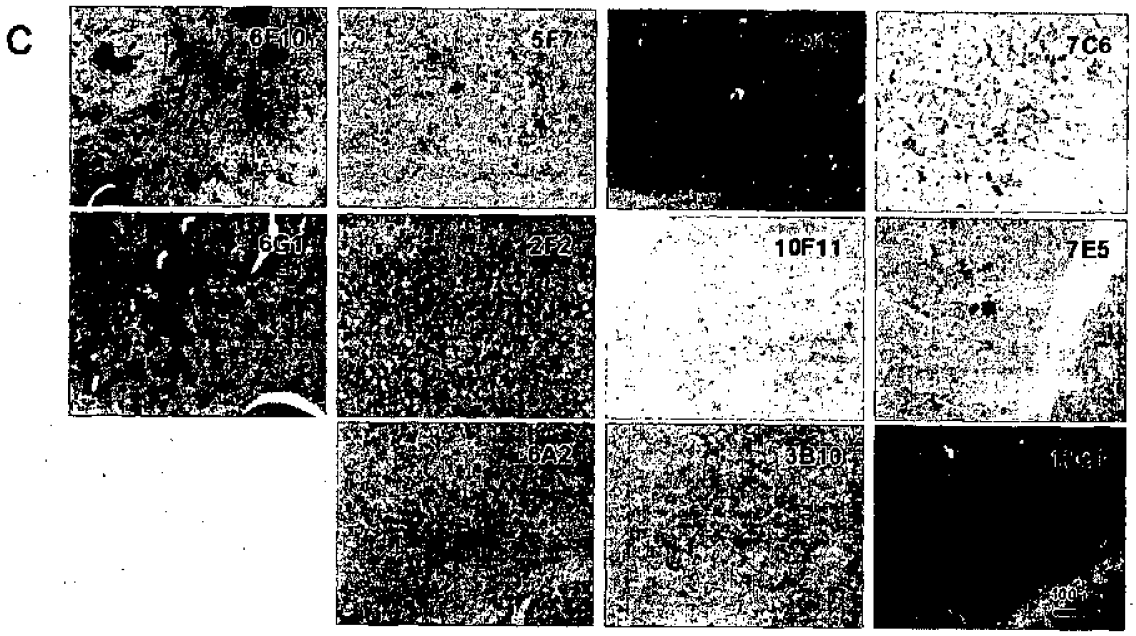
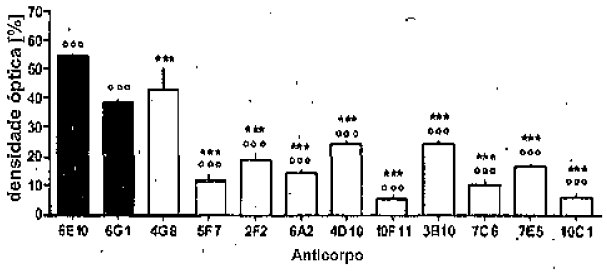
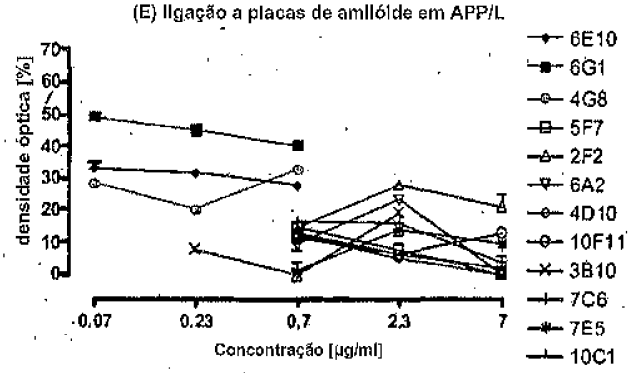


FIG. 8 (D-H)

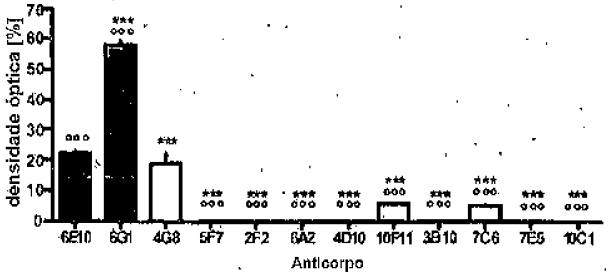
D) ligação a placas de amilóide em Tg2576



(E) ligação a placas de amilóide em APP/L



F) ligação a placas de amilóide em DA (RZ55)



(G) ligação a placas de amilóide em DA (RZ16)

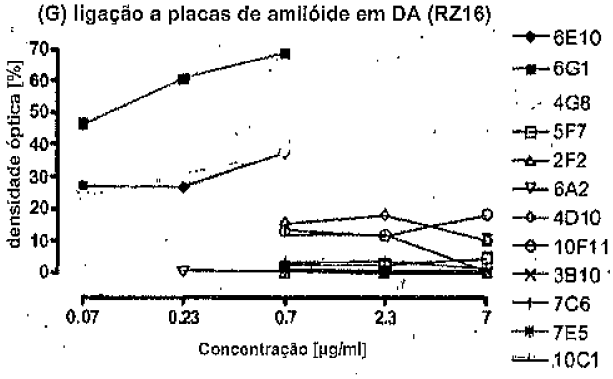


FIG. 8

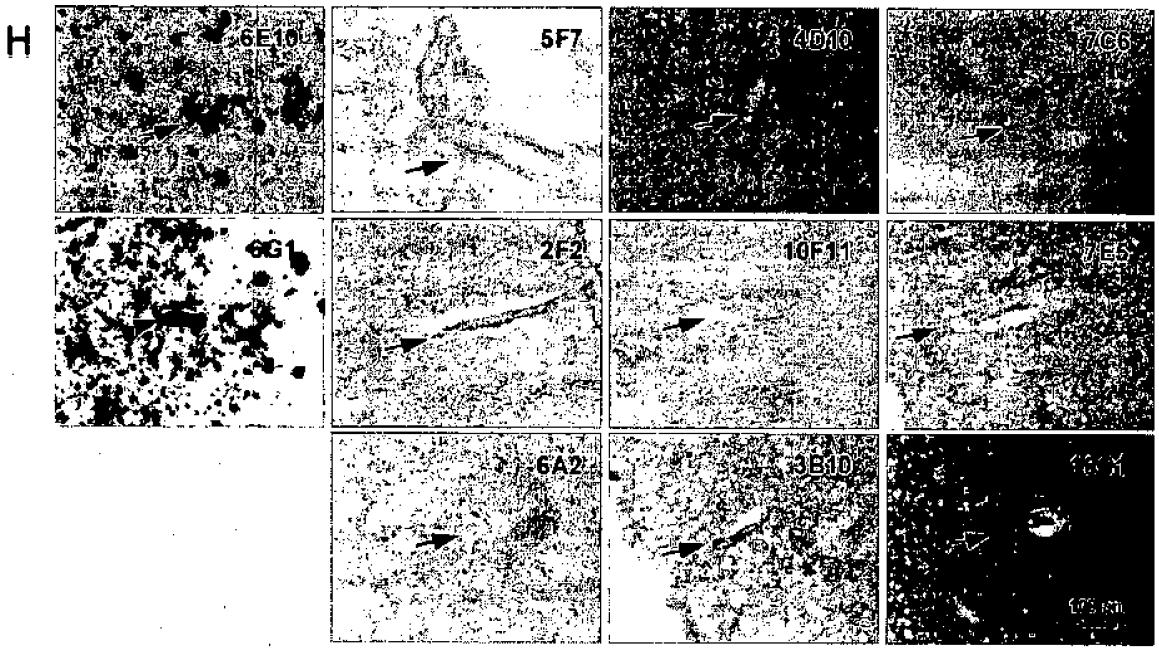


FIG. 9

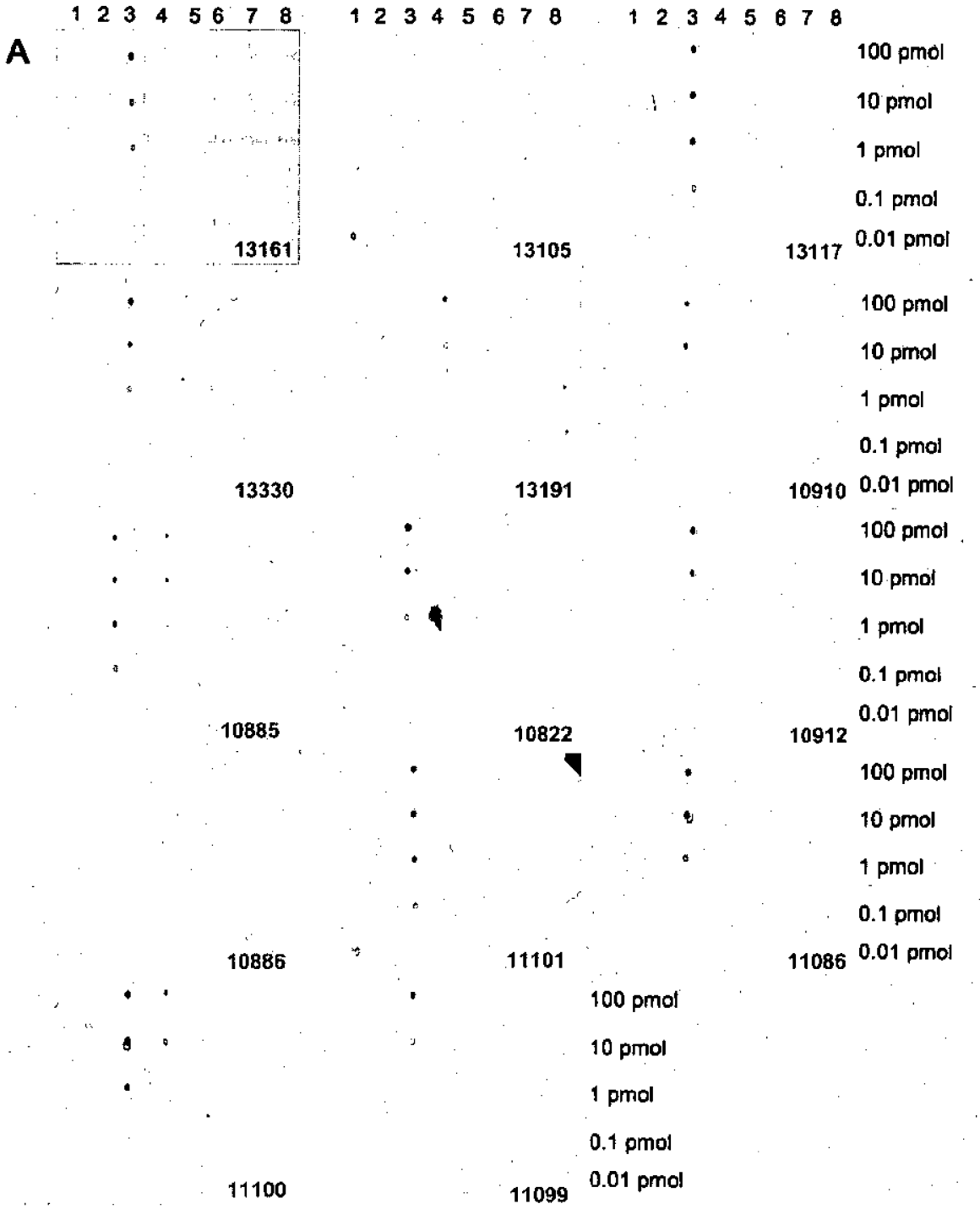

A
1 2 3 4 5 6 7 8
13161
13105
13117
13330
13191
10910
10885
10822
10912
10886
11101
11086
11100
11099
100 pmol
10 pmol
1 pmol
0.1 pmol
0.01 pmol

FIG. 9

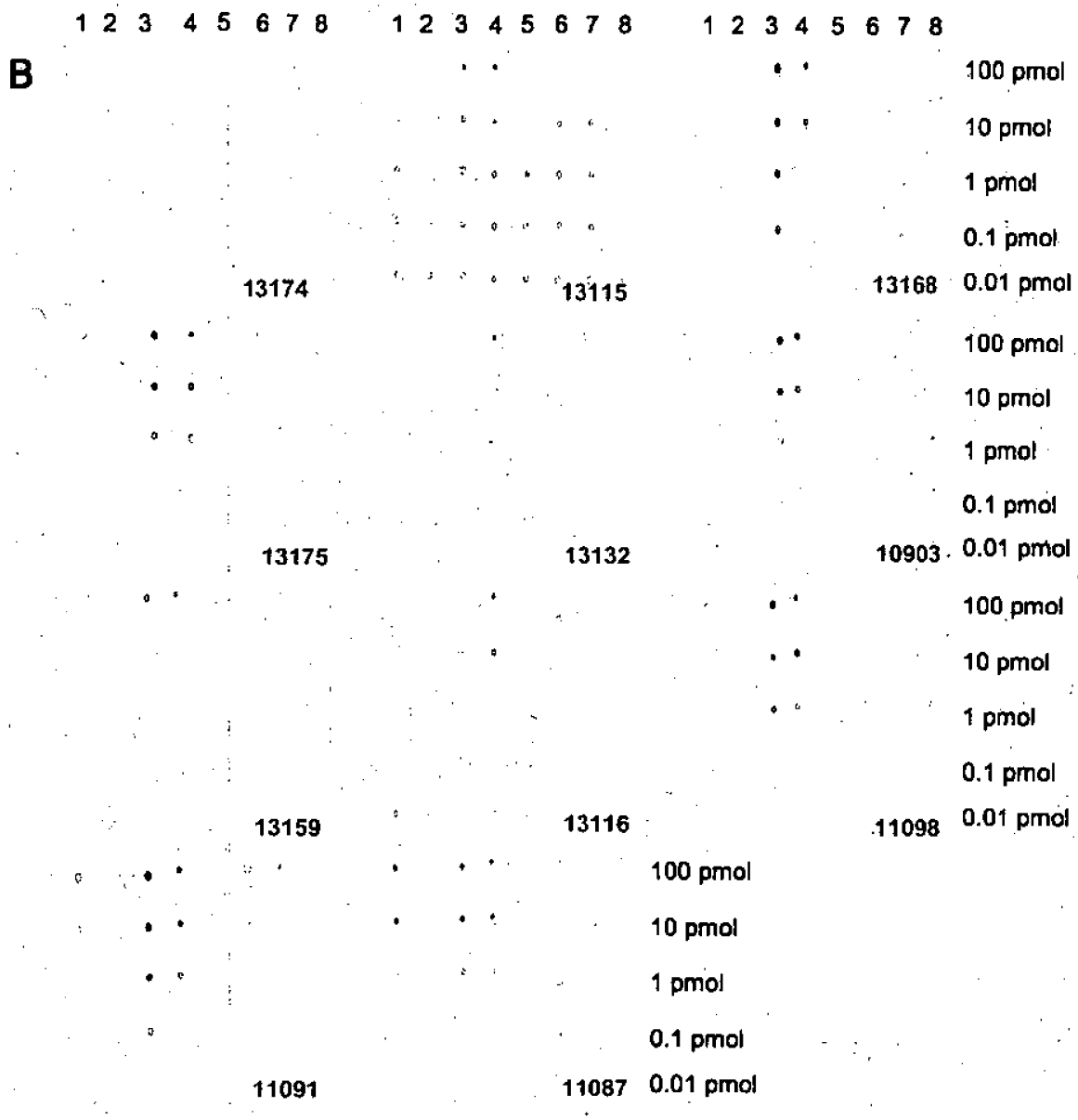

B
1 2 3 4 5 6 7 8
1 2 3 4 5 6 7 8
1 2 3 4 5 6 7 8
100 pmol
10 pmol
1 pmol
0.1 pmol
13174
13115
13168
0.01 pmol
100 pmol
10 pmol
1 pmol
0.1 pmol
13175
13132
10903
0.01 pmol
100 pmol
10 pmol
1 pmol
0.1 pmol
13159
13116
11098
0.01 pmol
100 pmol
10 pmol
1 pmol
0.1 pmol
11091
11087
0.01 pmol

FIG. 9

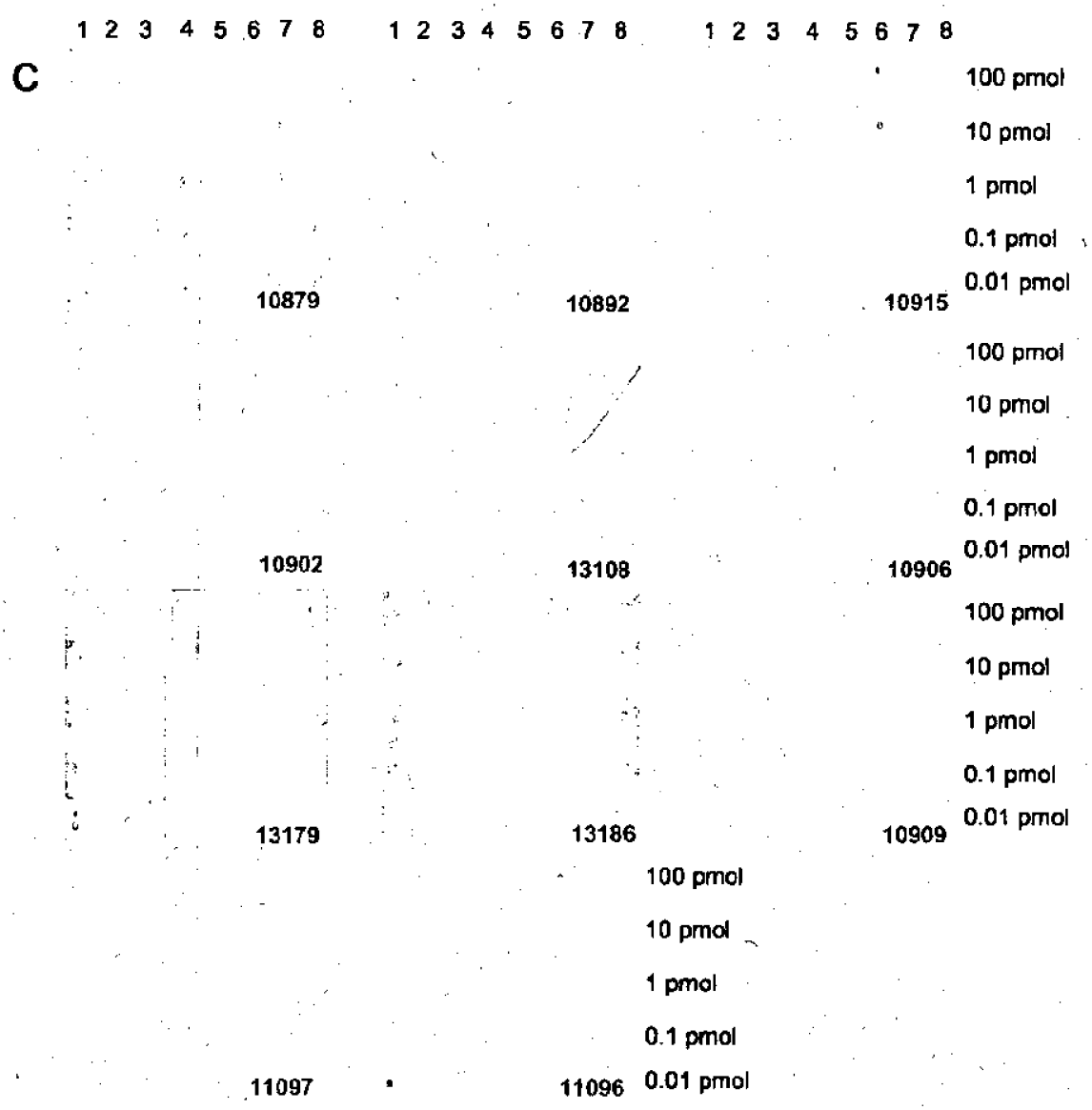

1 2 3 4 5 6 7 8
1 2 3 4 5 6 7 8
1 2 3 4 5 6 7 8
C
100 pmol
10 pmol
1 pmol
0.1 pmol
0.01 pmol
10879
10892
10915
100 pmol
10 pmol
1 pmol
0.1 pmol
0.01 pmol
10902
13108
10906
100 pmol
10 pmol
1 pmol
0.1 pmol
0.01 pmol
13179
13186
10909
100 pmol
10 pmol
1 pmol
0.1 pmol
0.01 pmol
11097
11096

FIG. 9

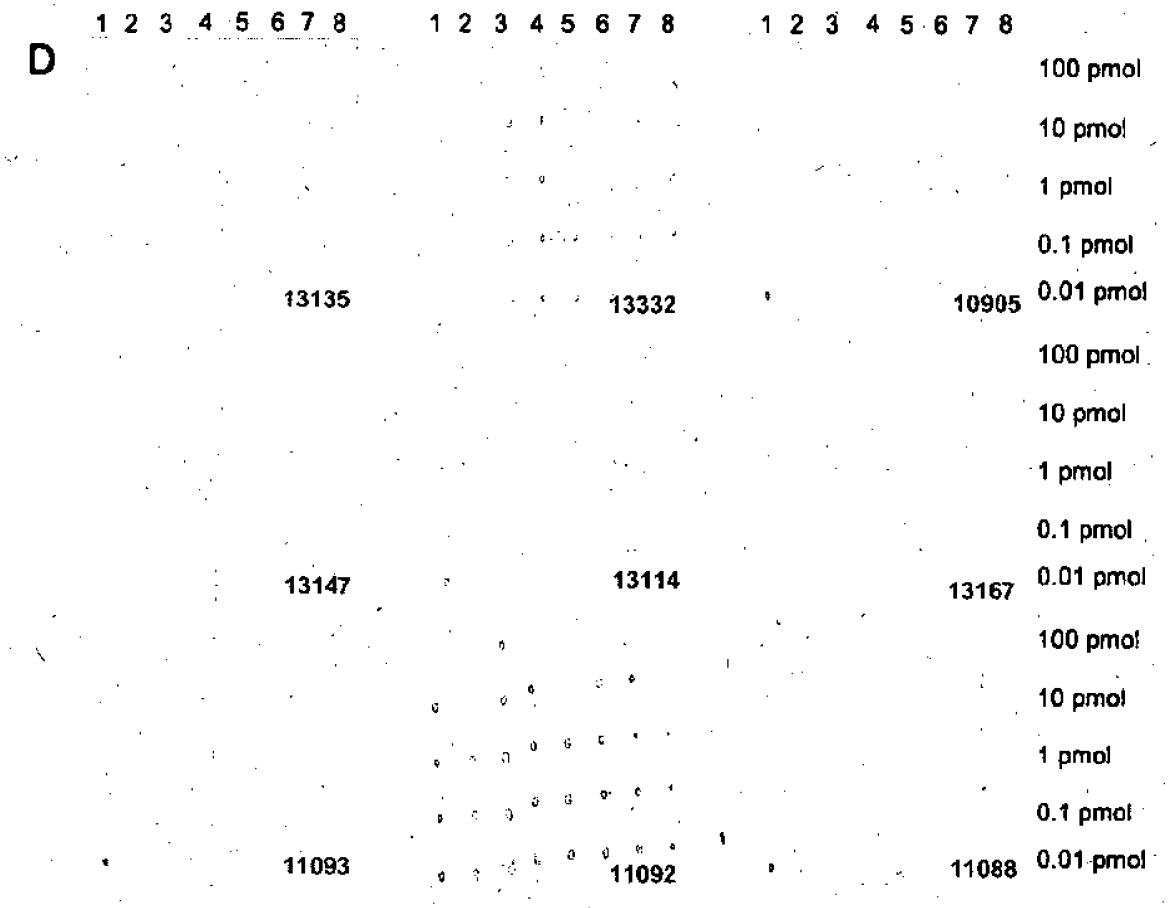

D
1 2 3 4 5 6 7 8
1 2 3 4 5 6 7 8
1 2 3 4 5 6 7 8
100 pmol
10 pmol
1 pmol
0.1 pmol
0.01 pmol
13135
13332
10905
100 pmol
10 pmol
1 pmol
0.1 pmol
0.01 pmol
13147
13114
13167
100 pmol
10 pmol
1 pmol
0.1 pmol
0.01 pmol
11093
11092
11088

FIG. 10

	7C6->BA199 globulómero Aß(20-42) tecido cerebral [pmol/g]	10F11->BA199 globulómero Aß(20-42) tecido cerebral [pmol/g]	5F7->BA199 globulómero Aß(20-42) tecido cerebral [pmol/g]
RZ16 (DA)	50,1	10,6	10,2
RZ 52 (DA)	43,9	14,3	13,9
RZ 55 (DA)	13,9	2,9	3,6
RZ 92 (controlo)	< 0,2	< 0,06	< 0,06

FIG. 11

A1) VH ML15-5F7

SEQ ID NO:1

CAGGTCCAGCTGAAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGACTTC
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTACCTTCTATAT
ACACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAATG
ATTGGTCCTGGAAGTGGTAATACTTACTACAATGAGATGTTCAAGGACAA
GGCCACATTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCA
GCAGCCTCACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGCAAAG
TCAGCTCGGGCGGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCAC
TGTCTCTGCA

SEQ ID NO:3

QVQLKQSGAELVRPGTSVKMSCKASGYTFTTFYIHWVKQRPGQGLEWIGMI
GPGSGNTYYNEMFKDKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARAKSAR
AAWFAYWGQGTLVTVSA

A2) VL ML15-5F7

SEQ ID NO:2

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGAT
CAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCGTTGTACAGAGTAATGG
AAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGC
TCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCA
GTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGA
GGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTCACATGTTCCTCC
CACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

SEQ ID NO:4

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSVVQSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLI
YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPPTFGGG
TKLEIKR

B1) VH ML15-10F11

SEQ ID NO:5

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTC
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTAGCTATGTTAT
GCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATA
TTTATCCTTACAATGATGGTACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAAG
GCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCACAGTATATATGGAGCTCAG
CAGCCTGACCTCTGAGGACTCTACAGTCTATTACTGTACAGTAGAGGGTG
CTACCTGGGACGGGTACTTCGATGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCA

SEQ ID NO:7

QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQRPGQGLEWIGYI
YPYNDGTKYNEKFKGKATLTSDKSSSTVYMELSSLTSEDSTVYYCTVEGATW
DGYFDVWGTGTTVTVSS

B2) VL ML15-10F11

SEQ ID NO:6

GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATTGGACAA
TCAGCCTCTATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAAAGGA
AAAACCTATTTGAATTGGTTATTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCG
CCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCAC
TGGCAGTGGATCAGGAACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAG
GCTGAGGATTTGGGAGTTTATTACTGCGTGCAAGGTACACATTTTCCTCAC
ACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

SEQ ID NO:8

DVVMTQTPLTLSVTIGQSASISCKSSQSLLYSKGKTYLNWLLQRPGQSPKRLI
YLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCVQGTHFPHTFGG
GTKLEIKR

C1) VH ML13-7C6

SEQ ID NO:9

GAAGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGT
CCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGCCA
TGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGCGAAGAGGCTAGAGTGGGTCGCGTCC
ATTCATAATAGAGGTACTATCTTCTATCTAGACAGTGTGAAGGGCCGATTC
ACCATCTCCAGAGATAATGTCAGGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAG
TCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATATATTACTGTACAAGAGGCCGGAGTA
ACTCCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCT
CG

SEQ ID NO:11

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPAKRLEWVASIH
NRGTIFYLDSVKGRFTISRDNVRNTLYLQMSSLRSEDTAIYYCTRGRSNSYAM
DYWGQGTSVTVSS

C2) VL ML13-7C6

SEQ ID NO:10

GATGTTTTGGTGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGGCTTGGAGAT
CAAGCCTCCATCTCTTGCCGATCTACTCAGACCCTTGTACATCGTAATGGA
GACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGTC
CCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAG
CGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAG
GCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTCACATGTTCCGTAC
ACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

SEQ ID NO:12

DVLVTQSPLSLPVRLGDQASISCRSTQTLVHRNGDTYLEWYLQKPGQSPKSLI
YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPYTFGGG
TKLEIKR

D1) VH ML15-4B7

SEQ ID NO:13

GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGCTC
CCGGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTGACTACGAAAT
GGTGTGGGTTCGACAGGCTCCAGGGGAGGGGCTGGAGTGGGTTGCATACA
TTAGTAGTGGCAGTCGTACCATCCACTATGCAGACACAGTGAAGGGCCGA
TTCACCATCTCCAGAGACAATCCCAAGAACACCCTGTTCCTGCAAATGAG
CAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGGACATTAC
TACGGCTACACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCATTCTCACAGTCTCCT
CA

SEQ ID NO:15

EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSDYEMVWVRQAPGEGLEWVAYI
SSGSRTIHYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMSSLRSEDTAMYYCARTLLRLH
FDYWGQGTILTVSS

D2) VL ML15-4B7

SEQ ID NO:14

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTCAGTTGGAGAG
AAGGTTACTATGAGCTGCAGGTCCAGTCAGAGCCTTTTCTATAGGAGCAA
TCAAAAGAACTTCTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTA
AACTGCTGATTTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCT
TCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTG
AAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGCTATCC
GTGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO:16

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCRSSQSLFYRSNQKNFLAWYQQKPGQSPKL
LIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYSYPWTFG
GGTKLEIKR

E1) VH ML15-2F2

SEQ ID NO:17

CAGGTCCAGCTGAAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGACTTC
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTACCTTCTATAT
ACACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAATG
ATTGGTCCTGGAAGTGGTAATACTTACTACAATGAGATGTTCAAGGACAA
GGCCACATTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCA
GCAGCCTCACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGCAAAG
TCAGCTCGGGCGGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCAC
TGTCTCTGCA

SEQ ID NO:19

QVQLKQSGAELVRPGTSVKMSCKASGYTFTTFYIHWVKQRPGQGLEWIGMI
GPGSGNTYYNEMFKDKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARAKSAR
AAWFAYWGQGTLVTVSA

E2) VL ML15-2F2

SEQ ID NO:18

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGAT
CAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCGTTGTACAGAGTAATGG
AAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGC
TCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCA
GTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGA
GGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTCACATGTTCCTCC
CACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

SEQ ID NO:20

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSVVQSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLI
YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPPTFGGG
TKLEIKR

F1) VH ML15-6A2

SEQ ID NO:21

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGACTTC
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTACCTTCTATAT
ACACTGGGTGAGGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAATG
ATTGGTCCTGGAAGTGGTAATACTTACTACAATGAGATGTTCAAGGACAA
GGCCACATTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCA
GCAGCCTCACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGCAAAG
TCACATCGGGCGGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCAC
TGTCTCTGCA

SEQ ID NO:23

QVQLQQSGAELVRPGTSVKMSCKASGYTFTTFYIHWVRQRPGQGLEWIGMI
GPGSGNTYYNEMFKDKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARAKSHR
AAWFAYWGQGTLVTVSA

F2) VL ML15-6A2

SEQ ID NO:22

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGAT
CAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCGTTGTACAGAGTAATGG
AAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGC
TCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTTTGGGGTCCCAGACAGGTTCA
GTGGCAGTAGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGA
GGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTCACATGTTCCTCC
CACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

SEQ ID NO:24

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSVVQSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLI
YKVSNRFFGVPDRFSGSRSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPPTFGGG
TKLEIKR

G1) VH ML13-4D10

SEQ ID NO:25

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCAGGACCTAGCCTAATACAGCCCTCACAGAG
CCTGTCCATAACCTGCACAGTCTCTGGTTTCTCATTAACTAGCTATGGTGT
ACACTGGGTTCGCCAGTCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTGA
TATGGAGAGGTGGAAGGATAGACTATAATGCAGCTTTCATGTCCAGACTG
AGCATCACCAAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTTAAAATGAACAG
TCTGCAAGCTGATGACACTGCCATATACTACTGTGCCAGAAACTCCGATG
TCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:27

QVQLKQSGPSLIQPSQSLSITCTVSGFSLTSYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWR
GGRIDYNAAFMSRLSITKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAIYYCARNSDVWGT
GTTVTVSS

G2) VL ML13-4D10

SEQ ID NO:26

GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATTGGACAA
CCAGCCTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATATTGATGGA
AAGACATATTTGAATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCG
CCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCAC
TGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAG
GCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTTCCGTAC
ACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

SEQ ID NO:28

DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIY
LVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPYTFGGG
TKLEIKR

H1) VH ML15-7E5

SEQ ID NO:29

GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGCTC
CCGGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTGACTACGAAAT
GGTGTGGGTTCGACAGGCTCCAGGGGAGGGGCTGGAGTGGGTTGCATACA
TTAGTAGTGGCAGTCGTACCATCCACTATGCAGACACAGTGAAGGGCCGG
TTCACCATCTCCAGAGACAATCCCAAGAACACCCTGTTCCTGCAAATGAG
CAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGGACATTAC
TACGGCTACACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCATTCTCACAGTCTCCT
CA

SEQ ID NO:31

EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSDYEMVWVRQAPGEGLEWVAYI
SSGSRTIHYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMSSLRSEDTAMYYCARTLLRLH
FDYWGQGTILTVSS

H2) VL ML15-7E5

SEQ ID NO:30

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTCAGTTGGAGAG
AAGGTTACTATGAGCTGCAGGTCCAGTCAGAGCCTTTTCTATAGGAGCAA
TCAAAAGAACTTCTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTA
AACTGCTGATTTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCT
TCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTG
AAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGCTATCC
GTGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO:32

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCRSSQSLFYRSNQKNFLAWYQQKPGQSPKL
LIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYSYPWTFG
GGTKLEIKR

I1) VH ML15-10C1

SEQ ID NO:33

GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTTTAGTGCAGCCTGGAGGCTC
CCGGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTGACTACGAAAT
GGTGTGGGTTCGACAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTGCATACA
TTAATAGTGGCAGTGGTACCATCCACTATGCAGACACAGTGAAGGGCCGA
TTCACCATCTCCAGAGACAATCCCAAGAACACCCTGTTCCTGCAAATGAG
CAGTCTAAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGGACATTAC
TACGGCTACACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCATTCTCACTGTCTCCT
CA

SEQ ID NO:35

EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSDYEMVWVRQAPGKGLEWVAYI
NSGSGTIHYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMSSLRSEDTAMYYCARTLLRLH
FDYWGQGTILTVSS

I2) VL ML15-10C1

SEQ ID NO:34

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTCAGTTGGAGAG
AAGGTTACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTCTATAGTCGCAAT
CAAAAGAACTTCTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAA
ACTGCTGATTTACTGGGCATCCACTGGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTT
CACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGA
AGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTTTAGCTATCCGT
GGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG

SEQ ID NO:36

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLFYSRNQKNFLAWYQQKPGQSPKL
LIYWASTGESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYFSYPWTFG
GGTKLEIKR

J1) VH ML15-3B10

SEQ ID NO:37

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTC
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTGACTATGTTAT
ACACTGGGTGAAGCAGAAGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATA
TTAATCCTTACAATGATGGTACTCAGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAAG
GCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCACAGTCTACATGGAGCTCAG
CAGTCTGACCTCTGAGGACTCTACAGTCTACTACTGTACAGTAGAGGGTG
GTACCTGGGACGGGTATTTCGATGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCA

SEQ ID NO:38

QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYVIHWVKQKPGQGLEWIGYI
NPYNDGTQYNEKFKGKATLTSDKSSSTVYMELSSLTSEDSTVYYCTVEGGTW
DGYFDVWGTGTTVTVSS