



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

(21) BR 112014013086-8 A2



(22) Data do Depósito: 28/11/2012

(43) Data da Publicação Nacional: 27/10/2020

(54) Título: COMPOSIÇÕES PARA TRATAMENTO DE DOENÇA ASSOCIADA COM PROTEÍNA AMILOIDE AGREGADA E PARA DETECTAR OU GERAR IMAGEM DE AMILOIDE AGREGADA E USO DAS REFERIDAS COMPOSIÇÕES

(51) Int. Cl.: A61K 38/16; A61K 47/48; C07K 14/01; G01N 33/00; A61P 25/28.

(30) Prioridade Unionista: 02/10/2012 US 61/708,709; 27/11/2012 US 61/730,316; 29/11/2011 US 61/564,602.

(71) Depositante(es): NEUROPHAGE PHARMACEUTICALS, INC..

(72) Inventor(es): RAJARAMAN KRISHNAN.

(86) Pedido PCT: PCT US2012066793 de 28/11/2012

(87) Publicação PCT: WO 2013/082114 de 06/06/2013

(85) Data da Fase Nacional: 29/05/2014

(57) Resumo: USO DE P3 DE BACTERIÓFAGO COMO AGENTES DE LIGAÇÃO A AMILOIDE. A invenção se refere a agentes e a composições farmacêuticas para reduzir a formação de amiloide e/ou para promover a desagregação de proteínas amiloides. As composições também podem ser usadas para detectar amiloide.

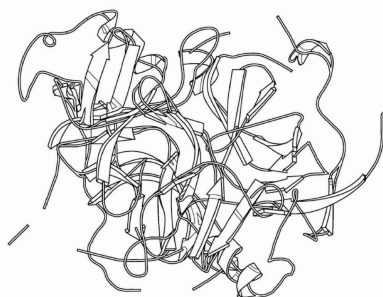


FIG. 1

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"COMPOSIÇÕES PARA TRATAMENTO DE DOENÇA ASSOCIADA COM PROTEÍNA AMILOIDE AGREGADA E PARA DETECTAR OU GERAR IMAGEM DE AMILOIDE AGREGADA E USO DAS REFERIDAS COMPOSIÇÕES"**.

[001] A invenção refere-se a composições farmacêuticas que compreendem a proteína g3p de bacteriófago filamentosos, fragmentos de ligação a amiloide da g3p e mutantes de ligação a amiloide e variantes da g3p, e ao uso dessas composições como uma terapêutica para diminuir a carga amiloide associada a doenças, tais como doenças amiloides sistêmicas e periféricas, doenças neurodegenerativas incluindo tauopatias neurodegenerativas e encefalopatias espongiformes transmissíveis (doenças associadas ao príon). Também está englobado o uso dessas composições para evitar o acúmulo de carga amiloide associada a essas doenças e o uso dessas composições como diagnóstico para detectar amiloide e, assim, diagnosticar essas doenças.

[002] O bacteriófago filamentosos M13, e fagos filamentosos relacionados, têm mostrado utilidade em modelos animais de doença por dobramento errado de proteína, e, portanto, representam uma potencial classe terapêutica para as doenças por dobramento errado de proteína. Vide Publicação de Patente dos Estados Unidos US 2011/0142803, incorporada neste documento em sua totalidade para referência. Em particular, foi descoberto que bacteriófagos filamentosos têm a capacidade de mediar a depuração de amiloide que já se formou no cérebro. Vide, por exemplo, WO2006083795 e WO2010060073, incorporadas neste documento em sua totalidade para referência.

[003] As doenças de formação de amiloide são caracterizadas por degeneração neuronal e a presença de proteínas dobradas erroneamente, agregadas no cérebro. Essas proteínas dobradas erroneamente e agregadas variam em diferentes doenças, mas na

maioria dos casos, elas têm uma estrutura em folha beta-pregueada-cruzada que se liga ao corante Congo Red e mostra uma birrefringência verde-maçã. A remoção de amiloide é esperada reduzir, retardar a progressão, ou mesmo reverter os sintomas associados a uma variedade de doenças caracterizadas por amiloide.

[004] Potenciais abordagens terapêuticas para prevenir e/ou reverter a patologia e/ou os sintomas associados a doenças de formação de amiloide incluem, por exemplo, inibição da formação de amiloide, promoção da depuração de amiloide e inibição da agregação de amiloide. Vide, por exemplo, Aguzzi & O'Connor, *Nature Review Drug Discovery* (2010) 9:237-48. A remoção e/ou prevenção da formação de oligômeros tóxicos também pode ser benéfica no tratamento e na prevenção de doenças de formação de amiloide. Id.

[005] Doenças neurodegenerativas conhecidas por estarem associadas a proteínas de dobramento errado e/ou agregadas incluem a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doenças de príon, tauopatias neurodegenerativas, esclerose lateral amiotrófica (ALS), ataxia espinocerebelar (SCA1), (SCA3), (SCA6), (SCA7), doença de Huntington, atrofia dentato-rubro-palido-luisiana, atrofia muscular espinhal e bulbar, angiopatia amiloide cerebral hereditária, amiloidose familiar, degeneração lobar frontotemporal (FTLD) incluindo demência do lobo frontotemporal, demência britânica/dinamarquesa e encefalopatia familiar. Outras doenças envolvem proteínas de dobramento errado e/ou agregadas na periferia - as assim chamadas amiloidoses periféricas. Vide, por exemplo, Chiti & Dobson, *Annu Rev Biochem* (2006) 75:333-66; e Josephs et al., *Acta Neuropathol* (2011) 122:137-153. Há uma grande necessidade de prevenir e/ou reduzir a formação de agregados amiloides (isto é, proteínas com dobramento errado e/ou agregadas) para tratar ou reduzir os sintomas ou a gravidade dessas doenças.

[006] Recentemente, o National Institute on Aging e a Alzheimer's Association publicaram critérios para diagnosticar a demência "de todas as causas" e da doença de Alzheimer. Vide, McKhann et al., *Alzheimer's & Dementia*, (2011) 7(3):263-9. Com base na presente orientação, demência "de todas as causas" é diagnosticada quando os sintomas comportamentais ou cognitivos satisfazem cinco testes, que incluem, por exemplo, a interferência com a capacidade de função no trabalho ou em atividades habituais e um declínio dos níveis anteriores de funcionamento e execução. Os testes envolvem uma combinação de levantamento do histórico e avaliação cognitiva objetiva. Conforme descrito neste documento, a descoberta de que a proteína g3p de bacteriófago filamentosos, fragmentos de ligação a amiloide de g3p e mutantes de ligação a amiloide e variantes de g3p se ligam a amiloide fornece métodos complementares para diagnosticar qualquer doença ou demência resultante da formação de amiloide, incluindo demência "de todas as causas" e de Alzheimer.

[007] Bacteriófagos filamentosos são um grupo de vírus estruturalmente relacionados que infectam células bacterianas e contêm um genoma de DNA de fita única circular. Eles não matam seu hospedeiro durante a infecção produtiva. Rasched and Oberer, *Microbiol Rev* (1986) 50:401-427. Exemplos de bacteriófagos filamentosos incluem os fagos da família Ff (por exemplo, M13, f1 e fd). A sequência de nucleotídeos de fd é conhecida desde 1978. Beck et al., *Nucleic Acids Research* (1978) 5(12):4495-4503. A sequência completa de M13 foi publicada em 1980. van Wezenbeek et al., *Gene* (1980) 11:129-148. O fago f1 foi sequenciado em 1982. Hill and Petersen, *J. Virol.* (1982) 44(1):32-46. O genoma de f1 compreende 6407 nucleotídeos, um a menos que o fago fd. Este difere da sequência de fd em 186 nucleotídeos (incluindo uma deleção nucleotídica), levando a 12 diferenças de aminoácidos entre as proteínas dos fagos f1 e fd. A

sequência de f1 difere daquela de M13 em 52 nucleotídeos, resultando em 5 diferenças de aminoácidos entre as proteínas correspondentes. Id. As sequências de DNA de M13 e fd variam em 192 nucleotídeos (3%), e ainda apenas 12 dessas diferenças resultam em uma mudança na sequência de aminoácido correspondente (6,25%). van Wezenbeek et al., Gene (1980) 11:129-148.

[008] A estrutura do fago filamentoso está bem estabelecida e é revisada, por exemplo, em Marvin, Curr. Opin. em Struct. Biol. (1998) 8:150-158; Rasched and Oberer, Microbiological Reviews (1986) 50(4):401-427. O fago filamentoso tem um "revestimento" que compreende milhares de cópias de uma proteína de capsídeo maior codificada pelo gene 8 (g8p, p8 ou pVIII). Este é o complexo g8p-DNA montado que forma a forma filamentosa característica do fago. Proteínas de revestimento menores, isto é, aquelas que estão presentes em apenas algumas cópias (3-5), estão localizadas nas extremidades do filamento. Uma destas proteínas de ponta, a g3p (também conhecida como p3 ou pIII), é necessária para a ligação ao hospedeiro bacteriano e inicia a infecção.

[009] O fago M13 tem uma g3p madura de 406 aminoácidos. GenBank Ref Seq NP_510891.1 fornece uma sequência de referência que inclui a sequência sinal aminoterminal com 18 resíduos. As variantes que têm diferenças de aminoácido em comparação às sequências publicadas são comuns. O fago filamentoso da família I tem uma g3p que difere dos membros da família de Ff, mas mesmo entre as famílias, a g3p é ainda altamente conservada. Stassen et al., J Mol Evol (1992) 34:141-52.

[0010] Uma estrutura de cristal está disponível para g3p. Lubkowski et al., Structure (1998) 7(6) 711-722. A proteína compreende 3 domínios dobrados separados por sequências flexíveis de ligante ricas em glicina. Há dois domínios aminoterminais, N1 e N2,

compreendendo 262 aminoácidos, que interagem para formar um complexo N1-N2. O domínio carboxiterminal (CT, também chamado N3) tem 146 aminoácidos e serve para ancorar a g3p na partícula do fago por interações hidrofóbicas com a g8p. Marvin, *Current Opin. in Structural Biology* (1998) 8:150-158. Uma estrutura em fita disponível publicamente preparada usando o domínio N1-N2 da proteína de fusão 2g3p de Holliger, *J Mol. Biol.* (1999) 288(4):649-57 é apresentada na **Fig. 1**.

[0011] Ao contrário da maioria das proteínas, o desdobramento dos domínios N1 e N2 da forma "bloqueada" latente é necessário para que a g3p adquira sua atividade biológica nativa. Eckert & Schmid, *J. Mol. Biol.* (2007) 373:452-461. Na etapa inicial da infecção, N2 se liga ao pilus F bacteriano através dos resíduos na borda externa de N2. Deng & Perham, 2002. Essa ligação inicial por N2 "desbloqueia" a g3p, "abrindo" o complexo N1-N2, permitindo que o N1 então se ligue ao co-receptor TolA. Em um fragmento N1-N2 da g3p, a transição térmica para a etapa de desbloqueio inicial na qual o desdobramento de N2 ocorre numa temperatura de fusão (T_M) de 48,1°C. Parte do processo envolve uma isomerização na ligação peptídica de Gln212-Pro213. A conversão de Pro213 é *trans* no estado desbloqueado. O N1 permanece estavelmente dobrado até a segunda etapa, que ocorre numa T_M de 60,2°C. Revisado em Eckert & Schmid, 2007.

[0012] As mutações no fragmento N1-N2 têm sido usadas para estudar a estabilidade e a infectividade de vários mutantes. Eckert & Schmid, 2007. Uma variante, designada "3A" prejudicou a ligação do pilus e diminuiu a estabilidade do domínio N2. Para esta mutação, a T_M é diminuída para 42,6°C. 3A carrega as seguintes mutações: W181A, F190A e F194A. Outro mutante em N2, G153D, desestabilizou N2, diminuindo a T_M para 44,4°C. Um mutante Q129H desestabilizou N2, aumentando a T_M para 51,4°C. A variante IY contém as mutações

T101I e D209Y na dobradiça e aumenta a estabilidade do fragmento N1-N2 ($T_M = 56,5^\circ\text{C}$). IHY contém as mutações T101I, Q129H e D209Y ($T_M = 60,1^\circ\text{C}$). IIHY contém as mutações T13I, T101I, Q129H e D209Y ($T_M = 61,8^\circ\text{C}$). Ambas as mutações de Q129Y e T13I estão se estabilizando, e a adição dessas mutações aumenta ainda mais a temperatura de fusão, T_M . A infecciosidade do fago variou inversamente com a força das interações do domínio dentro da g3p. Eckert & Schmid, 2007. A deleção do domínio N2 (fago fd(Δ N2)) aumentou a infectividade, removendo o efeito bloqueador do domínio N2 na ligação de N1 do TolA. *Id.*

[0013] A invenção é baseada, em parte, na descoberta de que a g3p também medeia a ligação do fago filamentosso ao amiloide de forma análoga ao processo pelo qual o fago infecta bactérias. A Patente U.S. Nº. 7.867.487 postulou que o mecanismo básico da eficácia terapêutica do fago na desagregação do amiloide relatada nessa patente era que o comprimento, finura, estrutura do fago pode permitir que este se organize ao longo das fibras amiloides. Além disso, foi proposto que o alto teor alfa helicoidal presente na g8p, a proteína de revestimento maior, pode interferir com a estrutura em folha beta do amiloide. Esse mecanismo é consistente com o relatório da patente de que quantidades nanomolares do fago podem desagregar quantidades micromolares de β -amiloide, o que sugeriria um componente de alta cópia do fago, isto é, g8p, está mediando o efeito. Também é consistente com o relatório em US20110182948 de que o vírus do mosaico do tabaco, que tem uma estrutura semelhante ao fago filamentosso, pode causar a desagregação. Assim, este trabalho anterior sugeriu que a estrutura intacta (um longo filamento com várias alfa-hélices) foi importante para o efeito terapêutico ou que, se uma proteína de revestimento específica fosse importante, era uma proteína que era altamente representada no revestimento do fago, tal

como a g8p. Nenhum deste trabalho anterior forneceu qualquer sugestão de que um componente isolado do bacteriófago, ao contrário do fago intacto, poderia se ligar ao amiloide e/ou causar sua desagregação. Além disso, nunca houve qualquer sugestão de que uma proteína de revestimento menor do bacteriófago filamentosos desempenhasse um papel na sua capacidade de se ligar e desagregar o amiloide.

[0014] No entanto, esta divulgação fornece a evidência de um mecanismo alternativo (embora não necessariamente mutuamente exclusivo) de ação. O inventor encontrou que a g3p do fago se liga diretamente às fibras amiloides e que a desagregação mediada pelo fago é dependente desta etapa de ligação inicial. Reconhecimento do inventor de que a g3p é responsável pela ligação do amiloide mediada pelo fago filamentosos fornece um mecanismo para a eficácia terapêutica do bacteriófago, bem como fornece uma base para novas classes de terapêutica e diagnóstico.

[0015] Objetos e vantagens adicionais da invenção serão estabelecidos, em parte, na descrição que se segue e, em parte, estarão óbvios a partir da descrição ou podem ser aprendidos pela prática da invenção. Os objetos e as vantagens da invenção serão realizadas e alcançados por meio dos elementos e combinações particularmente salientadas nas reivindicações acrescentadas.

[0016] Deve ser entendido que tanto a descrição geral anterior e a seguinte descrição detalhada são apenas exemplares e explicativas e não são restritivas da invenção, conforme reivindicado.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0017] A **Fig. 1** apresenta uma estrutura em fita dos domínios N1 e N2 da g3p, e a dobradiça.

[0018] As **Figuras 2A-2C** apresentam alinhamentos das g3p's de diferentes fontes. A **Fig. 2A** é um alinhamento da g3p do fago M13

(SEQ ID NO: 1), Fd (SEQ ID NO:2), e F1 (SEQ ID NO: 3), incluindo uma sequência consenso (SEQ ID NO: 4). A **Fig 2B** mostra um alinhamento da g3p do fago I2-2 (SEQ ID NO: 5) e Ike (SEQ ID NO: 6), juntamente com uma sequência consenso entre I2-2 e Ike (SEQ ID NO: 7). A **Fig. 2C** apresenta a sequência de aminoácidos da g3p do fago If (SEQ ID NO: 8).

[0019] A **Fig. 3A** apresenta um estudo de ressonância plasmônica de superfície (SPR) da ligação do fago. A ligação às fibrilas A β foi comparada à ligação aos monômeros A β usando 10^{14} fago/mL circulado através do chip de biossensor. A **Fig. 3B** mostra o K_a , K_d e K_D calculados a partir dos dados de SPR mostrados na **Fig. 3A**.

[0020] As **Figuras 4A e 4B** apresentam estudos de ligação. A **Fig. 4A** mostra um ensaio de ligação direta para duas doses do fago (10^{11} /mL e 10^{12} /mL) com quantidades molares crescentes de fA β 42. A **Fig. 4B** é um estudo de competição de ligação e fornece uma maneira alternativa para determinar o K_D para a ligação de M13. O Construto 1 foi usado.

[0021] A **Fig. 5** mostra os resultados da competição de ligação usando M13 (Construto 1) desnaturado pelo calor (caixas - 90°C por 10 minutos) versus de conformação nativa (círculos) no ensaio de competição de ligação à fibra amiloide.

[0022] A **Fig. 6** mostra um ensaio de fluorescência com Tioflavina T (ThT) usando fA β 42 incubado na presença ou ausência de 2 concentrações do fago M13 (Construto 1).

[0023] As **Figuras 7A e 7B** mostram o efeito da variação de parâmetros de ensaio individuais no ensaio de desagregação com ThT. A **Fig. 7A** apresenta os percentuais de desagregação na presença de duas concentrações de sal (0,15 M e 1,5 M). A **Fig. 7B** apresenta os percentuais de fA β remanescente em duas temperaturas (4°C e 37°C). O construto 1 foi usado.

[0024] As **Figuras 8A e 8B** representam ensaios de ligação a amiloide por M13 usando fA β 42. Na **Fig. 8A**, a ligação de M13 é relatada usando temperaturas de incubação de 18°C a 58°C por 3 horas. A **Fig. 8B** mostra a cinética de ligação para incubações a 37°C vs. 50°C.

[0025] As **Figuras 9A-9C** mostram o efeito da remoção proteolítica da g3p nas interações fago-amiloide. A Arg C protease foi usada para retirar a g3p do fago M13 (M13 Δ g3p). A **Fig. 9A** apresenta os resultados de um estudo de competição de ligação A β usando fago M13 Δ g3p em comparação ao fago nativo (tratado de forma idêntica ao fago tratado com ArgC, mas sem o tratamento com a protease). A **Fig. 9B** mostra o efeito do tratamento com Arg C na infectividade do fago M13 Δ g3p, comparado ao fago nativo. A **Fig. 9C** compara o fago tratado com ArgC ao fago nativo no ensaio de desagregação.

[0026] As **Figuras 10A e 10B** apresentam os resultados de um ensaio de competição de ligação usando um fragmento N1-N2 da g3p, neste documento referido N1N2 solúvel recombinante (rs-g3p(N1N2); "Construto 3", M13 Δ g3p (tratado com Arg C) e M13 como competidores da ligação de M13 marcado ao fA β 42. A **Fig. 10B** mostra uma repetição do ensaio de competição.

[0027] A **Fig. 11** apresenta dados da competição para o fago fd, IIHY, AAA, e M13. Os fagos fd, AAA e IIHY foram pré-ativados a 50°C por 1,5 horas, em seguida os Fd, AAA, & IIHY ativados e não ativados foram comparados por sua capacidade de competir com o M13 marcado para a ligação a A β durante uma incubação de 45 minutos a 37°C.

[0028] A **Fig. 12A** mostra um esquema de rs-g3p(N1N2) (Construto 3). A **Fig. 12B** apresenta um perfil de troca iônica para rs-g3p(N1N2). A **Fig. 12** mostra os resultados de um ensaio de filtração em gel usando Sephacryl S-300 e rs-g3p(N1N2). A **Fig. 12D** mostra

um Western Blot de rs-g3p(N1N2) junto com controles de g3p e g8p. O fago M13 é corrido nas linhas 1 e 2 como um controle positivo e detectado com um anticorpo policlonal anti-M13, que detecta g8p e g3p. O rs-g3p purificado é corrido nas linhas 3 e 4 e detectado com o mesmo anticorpo policlonal anti-M13.

[0029] A **Fig. 13** apresenta dados de SPR usando rs-g3p(N1N2) (Construto 3). O rs-g3p(N1N2) potencialmente se liga ao fA β 42 com um K_D de cerca de 160 nM, mas não liga monômeros.

[0030] A **Fig. 14** apresenta um ensaio de fluorescência com ThT usado para medir o amiloide presente numa determinada amostra. 10 μ M de monômeros A β 42 foram incubados na presença ou ausência de 5 concentrações de rs-g3p(N1N2) (Construto 3) a 37 °C por 3 dias. A quantidade de fibras, formada no final dos 3 dias, foi medida, quantificando a fluorescência de ThT ligada. A IC_{50} é aproximadamente 20 nM, indicando que o rs-g3p(N1N2) potencialmente inibe a formação das fibras de A β 42. A figura também indica que a ligação é dependente da dose.

[0031] A **Fig. 15A** mostra os resultados da micrografia de elétron de transmissão (TEM) da incubação fA β 42 na presença ou ausência de rs-g3p(N1N2) (Construto 3). A **Fig. 15B** mostra os resultados de um ensaio de fluorescência com ThT usando A β 42 e rs-g3p(N1N2) (Construto 3) 2 μ M incubado a 37°C por 7 dias. O rs-g3p(N1N2) bloqueia a formação de fA β 42.

[0032] A **Fig. 16** demonstra que o rs-g3p(N1N2) (Construto 3) potencialmente inibe a formação das fibras de α -sinucleína. 25 μ M de α -sinucleína foram montados, agitando a 300 rpm por 4 dias a 37°C (vide, Barra 1). A segunda barra do gráfico representa os monômeros de alfa-sinucleína mais 1×10^{-13} do fago M13 pentamérico agitando a 37°C por 3 dias. Os resultados mostrados na barra 2 indicam que o M13 pentamérico bloqueia a montagem das fibras de α -sinucleína. A

terceira barra no gráfico representa os monômeros de alfa-sinucleína + 83 nM de monômeros de rsg3p. Os resultados mostrados na barra 3 indicam que os monômeros são menos eficazes em inibir a formação da fibra de α -sinucleína do que o M13 pentamérico. A barra 4 é um controle negativo, mostrando os monômeros de alfa sinucleína no tempo zero. Na barra 5, os monômeros da g3p sem as fibras da α -sinucleína são mostrados para determinar se a g3p se liga ao pTAA e sequestra o corante da ligação às fibras. Os resultados mostrados na barra 5 indicam que a g3p não se liga ao pTAA.

[0033] A **Fig. 17** apresenta os dados da ligação de competição para rs-g3p(N1N2) (Construto 3), M13 (Construto 2), proteína de fusão rs-g3p(N1N2)-hlgG4-Fc (Construto 4), e um controle negativo de IgG4-Fc.

[0034] A **Fig. 18** apresenta dados da ligação de competição, comparando M13 (Construto 2; quadrados), rs-g3p(N1N2) (Construto 3; triângulos), proteína de fusão rs-g3p(N1N2)-hlgG4-Fc (Construto 4; triângulos de cabeça para baixo), e um controle negativo de IgG4-Fc recombinante (diamantes).

[0035] A **Fig. 19** mostra um ensaio de aprisionamento em filtro, comparando cinco concentrações de fibras de A β 42 mais ou menos duas concentrações de M13 (Construto 2), rs-g3p(N1N2) (Construto 3) 800 nM, e três concentrações da proteína de fusão rs-g3p(N1N2)-hlgG4-Fc (Construto 4).

[0036] A **Fig. 20** apresenta os dados de ligação de competição para o rs-g3p(N1N2) (Construto 3; "monômero") e rs-g3p(N1N2) conjugado à estreptavidina ("SA[g3pN1N2]_{n=2-4}"; "SA-g3p"; "tetramero"). O rs-g3p(N1N2) e SA-g3p foram comparados por sua capacidade de competir com o M13 marcado para a ligação ao A β durante uma incubação de três horas a 37°C.

[0037] A **Fig. 21** mostra um ensaio de aprisionamento em filtro,

comparando cinco concentrações de fA β 42 mais ou menos duas concentrações de rs-g3p(N1N2) (Construto 3; "monômero") e duas concentrações de SA-g3p ("tetrâmero").

[0038] As **Figuras 22A e 22B** mostram TEMs de fA β 42 no tempo zero (**Fig. 22A**) e três dias após a incubação com SA-g3p (**Fig. 22B**).

[0039] A **Fig. 23** mostra a sequência de aminoácidos de um construto rs-g3p(N1N2)-hlgG4-Fc "Construto 4" (SEQ ID NO:9). A região N1N2 do "Construto 4" é derivada da região N1N2 do "Construto 1" (SEQ ID NO:10).

[0040] A **Fig. 24** mostra a sequência de aminoácidos de outro construto rs-g3p(N1N2)-hlgG4-Fc "Construto 5" (SEQ ID NO:11). A região N1N2 do "Construto 5" é derivada da região N1N2 do "Construto 2" (SEQ ID NO:12).

[0041] A **Fig. 25** mostra a sequência de aminoácidos de um construto rs-g3p(N1N2)-hlgG1-Fc "Construto 6" (SEQ ID NO:13). A região N1N2 do "Construto 6" é derivada da região N1N2 do "Construto 2".

[0042] A **Fig. 26** mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos de N2 de: fd (SEQ ID NO:14), f1 (SEQ ID NO:15), M13 (SEQ ID NO:16), Ike (SEQ ID NO:17), I2-2 (SEQ ID NO:18), e If1 (SEQ ID NO:19). Um asterisco "*" indica as posições que têm um resíduo único, totalmente conservado. Um dois-pontos ":" indica a conservação entre grupos de propriedades fortemente semelhantes que pontuam mais do que 0,5 na matriz Gonnet PAM 250. Um período "." indica a conservação entre grupos de propriedades fracamente semelhantes que pontuam igual ou menos do que 0,5 na matriz Gonnet PAM 250.

[0043] A **Fig. 27A** mostra um esquema do Construto 3. A **Fig. 27B** mostra a sequência de DNA da porção de g3p do Construto 3 (SEQ ID NO:23). A **Fig. 27C** mostra a sequência de aminoácidos da porção de g3p do Construto 3 (SEQ ID NO:24).

[0044] A **Fig. 28** mostra os resultados de um experimento que testa duas proteínas de fusão rs-g3p(N1N2)-IgG para sua capacidade de reduzir β -amiloide em um modelo de camundongo transgênico da doença de Alzheimer. O rs-g3p(N1N2)-hIgG4-Fc (Construto 5) e o rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (Construto 6) reduziram significativamente o nível de β -amiloide no hipocampo de camundongos com a doença de Alzheimer.

[0045] A **Fig. 29** mostra os resultados de um experimento que testa duas proteínas de fusão rs-g3p(N1N2)-IgG para sua capacidade de reduzir β -amiloide em um modelo de camundongo transgênico da doença de Alzheimer. O rs-g3p(N1N2)-hIgG4-Fc (Construto 5) e o rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (Construto 6) foram capazes de reduzir significativamente o nível de β -amiloide no córtex cerebral de camundongos com a doença de Alzheimer.

[0046] A **Fig. 30** mostra inibição da montagem de A β 42 com rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (Construto 6). A **Fig. 30A** mostra um gel de agarose "nativo" feito sem SDS. As amostras foram corridas no tampão TEA sem SDS e não fervido. Os resultados indicam que o Construto 6 é capaz de inibir a montagem de fA β 42. A **Fig. 30B** apresenta um ensaio de fluorescência com ThT usado para medir o amiloide presente numa determinada amostra. 10 μ M de monômeros de A β 42 foram incubados na presença ou ausência de 2 concentrações de rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (Construto 6) a 37 °C por 1 dia. A quantidade de fibras formadas no final do dia 1 foi medida, quantificando a fluorescência de ThT ligada. O rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (Construto 6) potencialmente inibe a formação das fibras de A β 42. A figura também indica que a inibição da formação da fibra com o Construto 6 é dependente da dose.

[0047] A **Fig. 31** apresenta dados de dicroísmo circular representativo, mostrando que a montagem de A β 42 é inibida pelo rs-

g3p(N1N2) (Construto 3). O dicróismo circular mede o conteúdo de α -hélice e folha- β das fibras de A β a ser avaliado. A **Fig. 31A** mostra a elipticidade versus o comprimento de onda para A β 42 em T= 0, T=24 horas e T=48 horas. A **Fig. 31B** mostra a elipticidade versus o comprimento de onda para A β 42 mais o Construto 3 em T= 0, T=24 horas e T=48 horas. A **Fig. 31C** mostra um ensaio representativo com ThT onde a quantidade de fibras formadas entre 24 e 48 horas foi medida, quantificando a fluorescência de ThT ligada. O Construto 3 potencialmente inibe a formação das fibras de A β 42. A **Fig. 31D** mostra a elipticidade versus o comprimento de onda para o Construto 3 em T= 0, T=24 horas e T=48 horas. Tomados em conjunto, esses dados confirmam a capacidade do Construto 3 em inibir a montagem de A β 42.

[0048] A **Fig. 32** apresenta dados representativos mostrando que o M13 (Construto 2) e o rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (Construto 6) bloqueiam a toxicidade induzida pelo oligômero de células N2a. Vide, por exemplo, Stine et al. (2003) J. Biol. Chem. 278(13): 11612-11622 e Stine et al. (2011) Erik D. Roberson (ed.) Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia, Methods in Molecular Biology, vol. 670: 13-32. As células N2a foram diferenciadas por deprivação de soro por 48 horas antes do tratamento. Os oligômeros de A β 42 (2 μ M) foram pré-incubados com o Construto 2 e Construto 6 a 37 °C por 3 horas antes da adição às células N2a. Os complexos de tempo zero ("TO") não foram pré-incubados. Após 24 horas de incubação, a liberação da adenilato quinase ("AK") foi monitorada. A liberação de AK no meio indica morte/lise celular. Os oligômeros de A β 42 foram feitos conforme descrito por Stine et.al., 2011. Os resultados indicam que M13 e rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc são potentes inibidores dos oligômeros tóxicos.

[0049] A **Fig. 33** mostra um ensaio de aprisionamento em filtro, comparando seis concentrações de fibras de A β 42 mais ou menos 1 x

10^{12} /ml M13 (Construto 2); 80 nm e 800 nM do construto rs-g3p(N1N2)-hIgG4-Fc (Construto 5); e 80 nm e 800 nM de rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (Construto 6). As fibras de A β 42 foram incubadas com os Construtos 2, 5 e 6 a 37°C por 3 dias, seguido por retardação em filtro. O filtro foi sondado por mAb 6E10 (1:15000), que reconhece as fibras de A β 42 aprisionadas no filtro. 800nM do Construto 5 ou Construto 6 iguala 5×10^{14} /ml do Construto 2 por molaridade molecular. Os resultados indicam que os Construtos 2, 5 e 6 potencialmente desagregam as fibras de β -amiloide.

[0050] As **Figuras 34A e 34B** apresentam ensaios representativos usados para medir a quantidade de M13 (Construto 2) ligado a fA β 42 após 3 horas de pré-incubação com ftau. 5 μ M de monômeros de A β 42 ligados ao Construto 2 foram incubados na presença ou ausência de 4 concentrações de ftau a 37 °C por 3 horas. Uma vez que o fAbeta:M13-Alexa488 forma péletes mas o ftau:M13-Alexa488 não forma péletes, a medição da perda de fluorescência do material peletizado indica que a ftau compete pela ligação ao fAbeta. Aqui, a quantidade de M13-fA β formado no final das 3 horas foi medida, quantificando a fluorescência do Alexa488 na reação de competição de ligação peletizada. Os resultados indicam que a ftau é capaz de competir com o M13-Alexa488 (Construto 2) pela ligação ao fA β 42.

[0051] A **Fig. 35** mostra os resultados de um ensaio de SPR representativo que testa a capacidade de rs-g3p(N1N2)-hIgG4-Fc (Construto 4) de se ligar à ftau. Os resultados indicam que o Construto 4 potencialmente se liga à ftau.

[0052] A **Fig. 36** mostra a capacidade de rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (Construto 6) para desagregar a ftau. As fibras de Tau foram preparadas, diluindo 40 μ M da região de repetição de ligação de microtúbulos ("MTBR") da tau em 50 mM de superóxido dismutase ("Sod"). Várias concentrações do Construto 6 e a ftau preparada foram

incubadas em tampão acetato em pH 7,0, 37 °C por 72 horas. A fluorescência de ThT foi registrada na presença de ThT em excesso de 5 vezes. A **Fig. 36A** apresenta os resultados de um ensaio com ThT representativo, mostrando a capacidade do Construto 6 em desagregar a ftau. A **Fig. 36B** mostra outro experimento representativo, confirmando a capacidade do Construto 6 em desagregar a tau. As **Figuras 36A e 36B** também mostram que a desagregação da ftau pelo Construto 6 é dependente da dose.

[0053] A **Fig. 37** apresenta experimentos representativos, mostrando a inibição da agregação de A β por rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (Construto 6) e rs-g3p(N1N2) (Construto 3) ao longo do tempo. A β 42 foi dissolvido em DMSO e diluído em PBS contendo NaN₃. A β 42 foi agregado em 37°C mais ou menos as diversas concentrações do Construto 3 e Construto 6. A agregação de A β 42 foi medida pela fluorescência de ThT. A **Fig. 37A** mostra um SDS-PAGE das amostras. A **Fig. 37B** mostra os resultados de um experimento representativo. A **Fig. 37C** mostra os resultados de outro experimento representativo. A **Fig. 37D** resume os resultados.

[0054] A **Fig. 38A e Fig. 38B** apresentam os resultados dos experimentos, mostrando a capacidade de rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (Construto 6) em bloquear a conversão de PrP em PrP-Sc. O Construto 6 e os lisados celulares de IgG foram submetidos à ultracentrifugação para separar as espécies de PrP solúvel (sobrenadante) e insolúvel (pélete). As espécies de PrP foram visualizadas bioquimicamente com anticorpo monoclonal anti-PrP (6D11). Na presença de IgG, existe um particionamento de PrP em frações solúveis e insolúveis. Na presença do Construto 6, há PrP insolúvel limitado. Os dados representam n=4.

[0055] A **Fig. 39A e a Fig. 39B** apresentam os resultados dos experimentos, mostrando a capacidade de rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc

(Construto 6) em reduzir o acúmulo de a agregação de PrP^{Sc} em um modelo de cultura de células da doença de príon. A **Fig. 39A** mostra lisados celulares de N2a22L^{Sc} bioquimicamente digeridos por PK e não digeridos redissolvidos após o tratamento com o Construto 6 e IgG. Uma redução significativa nos níveis de PrP^{Sc} é claramente observada nas células tratadas com concentrações crescentes do Construto 6. Uma redução de aproximadamente 50% nos níveis de PrP^{Sc} é alcançada com o tratamento de ~0,08ug/ml do Construto 6. O tratamento com 10ug/ml do Construto 6 reduz os níveis de PrP^{Sc} em 5,725%, $p < 0,0001$. Nenhuma alteração acentuada nos níveis de PrP^{Sc} foi observada nas células N2A22L^{Sc} tratadas com 1ug/ml de IgG murina. Para a **Fig. 39B**, as películas de raio X foram subsequentemente digitalizadas e inicialmente normalizadas para o efeito em células N2a22L^{Sc} tratadas com IgG a partir da mesma passagem que foi considerada como sendo 100%. Os dados da densitometria de manchas digeridas por PK foram então analisados em relação aos lisados não digeridos equivalentemente manchados e expressos com uma alteração percentual de PrP^{Sc}/PrP_C. Os dados representam n=4.

DESCRIÇÃO DAS MODALIDADES

[0056] A invenção baseia-se, em parte, no reconhecimento do inventor do papel da proteína 3 de gene ("g3p", também conhecido como "p3" ou "pIII") na mediação na ligação de amiloide e desagregação de agregados amiloides. A invenção também é baseada na identificação dos inventores de uma sequência mínima de g3p necessária para a ligação ao amiloide.

[0057] Assim, em determinadas modalidades, a invenção fornece moléculas, em particular, polipeptídeos, que compreendem as sequências consenso mínimas de ligação a amiloide derivadas da g3p. Em um aspecto dessas modalidades, as moléculas são solúveis. Em

outro aspecto dessas modalidades, as moléculas desagregam e/ou evitam a agregação de amiloide (por exemplo, placa amiloide). Em outro aspecto dessas modalidades, as moléculas são proteínas de fusão. Em um aspecto mais específico dessas modalidades, as moléculas são proteínas de fusão que compreendem, adicionalmente, uma sequência de aminoácidos de uma cadeia de imunoglobulina. Em um aspecto ainda mais específico dessas modalidades, as moléculas são proteínas de fusão que compreendem adicionalmente uma sequência de aminoácidos de uma cadeia da imunoglobulina G (por exemplo, IgG) ou da imunoglobulina M (por exemplo, IgM). Em ainda outro aspecto dessas modalidades, a molécula compreende o domínio N2 da g3p. Em um aspecto mais específico dessas modalidades, a molécula compreende o domínio N1-N2 da g3p. Em ainda outro aspecto dessas modalidades, a molécula compreende uma g3p de comprimento total. Em ainda outro aspecto, a molécula é um polipeptídeo que é um fragmento, mutante ou variante de qualquer um dos anteriores.

[0058] Em outros aspectos, a invenção fornece moléculas que se ligam ao TolA, tais como moléculas inibidoras de TolA, em particular, polipeptídeos, que compreendem sequências consenso mínimas de ligação a amiloide. As moléculas de ligação ao TolA e/ou inibidores de TolA da presente invenção se ligam a despolimerizam, evitam a agregação de, e desagregam o amiloide. As moléculas de ligação TolA e/ou moléculas inibidoras de TolA incluem proteínas de fusão. Em determinadas modalidades a molécula de ligação ao TolA e/ou a molécula inibidora de TolA é uma colicina ou fragmento de ligação a amiloide de uma colicina. Em determinadas modalidades, a colicina é uma colicina do Grupo A. Vide, por exemplo, Cascales et al., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (2007) 71(1): 158-229. As moléculas de ligação ao TolA e as moléculas inibidoras de TolA da invenção são terapêuticos úteis

para diminuir a carga amiloide associada a doenças, tais como doenças amiloides sistêmicas e periféricas, doenças neurodegenerativas, incluindo tauopatias neurodegenerativas e encefalopatias espongiformes transmissíveis (doenças associadas ao príon). Também está englobado o uso dessas composições para evitar o acúmulo de carga amiloide associada a essas doenças e o uso dessas composições como diagnóstico para detectar amiloide e, assim, diagnosticar essas doenças.

[0059] Em outra modalidade, a invenção fornece bacteriófagos filamentosos que foram modificados para superexpressar a g3p em comparação com o fago do tipo selvagem, para expressar um fragmento de ligação a amiloide da g3p, um mutante de ligação a amiloide ou forma variante de g3p, ou uma proteína de fusão de ligação a amiloide compreendendo a g3p.

[0060] A invenção fornece composições de matéria e/ou composições farmacêuticas de qualquer uma das moléculas anteriores ou do bacteriófago, bem como seu uso para se ligar a, desagregar e evitar a agregação de amiloide e seu uso para detectar depósitos de amiloide e diagnosticar doenças e distúrbios caracterizados por amiloide.

Definições

[0061] O termo "g3p", quando usado sozinho ou em termos, tais como "derivado de g3p", refere-se a qualquer proteína g3p de fago filamentoso recombinante ou do tipo selvagem (incluindo fragmentos, variantes e mutantes de g3p). O termo não deve ser interpretado como limitado a qualquer g3p de bacteriófago filamentoso específico. À título de exemplo, o termo "g3p" inclui a SEQ ID NO: 1 e as proteínas relacionadas mostradas na **Fig. 2**.

[0062] O termo "bacteriófago filamentoso" inclui tanto bacteriófago filamentoso do tipo selvagem quanto bacteriófago filamentoso

recombinante. No presente pedido, "bacteriófago filamentosos" também pode ser referido como "bacteriófago", "fago", ou "M13".

[0063] O termo "bacteriófago filamentosos do tipo selvagem", conforme usado neste documento, refere-se a fagos filamentosos encontrados na natureza, fagos filamentosos que foram indicados como "tipo selvagem" em qualquer banco de dados de sequência de nucleotídeos ou de aminoácidos, bacteriófagos filamentosos que são comercialmente disponíveis e caracterizados como "tipo selvagem", e bacteriófagos filamentosos que adquiriram mutações não recombinantes em relação a qualquer uma das passagens anteriores.

[0064] O termo "domínio" significa uma região de um polipeptídeo (incluindo proteínas) que tem alguma característica física ou papel distinto, incluindo, por exemplo, uma estrutura independentemente dobrada composta de uma seção de uma cadeia polipeptídica. Um domínio pode conter a sequência da característica física distinta do polipeptídeo ou pode conter um fragmento da característica física que mantém suas características de ligação (isto é, pode se ligar a um segundo domínio). Um domínio pode estar associado a outro domínio. Em outras palavras, um primeiro domínio pode se ligar naturalmente a um segundo domínio. Por exemplo, o domínio N2 da g3p se liga ao F-pili e o domínio N1 da g3p se liga ao TolA.

[0065] Os termos "amiloide", "fibrilas amiloides" e "fibras amiloides", conforme usado neste documento são termos genéricos para uma estrutura terciária que é formada pela agregação de qualquer uma de diversas proteínas diferentes e quem consistem em um arranjo ordenado de folhas β empilhadas perpendiculares a um eixo da fibra. Sunde et al., J. Mol. Biol. (1997) 273:729-39. Um amiloide exemplar é o agregado de β -amiloide formado na doença de Alzheimer, que é composto pelo peptídeo beta-amiloide " β A," que são 39-43 fragmentos internos de aminoácidos clivados da proteína

precursora de amiloide humana (hAPP). Existem formas curtas, tais como A β 40 e formas longas, tais como a isoforma A β mais fibrilogênica, A β 42. Outras proteínas amiloides exemplares incluem α -sinucleína (associada com a doença de Parkinson), huntingtina (associada com a doença de Huntington), tau (associada com a doença de Alzheimer) dobradas erroneamente e a conformação anormal da proteína do príon, PrP^{Sc}. Exemplos adicionais são fornecidos em toda a descrição e são conhecidos para aqueles versados na técnica (vide, por exemplo, Aguzzi (2010), e Eichner and Radford, Mol. Cell (2011) 43:8-18). Assim, a menos que uma proteína ou peptídeo seja especificado, o uso dos termos "amiloide", "fibrilas amiloides", ou "fibras amiloides" não deve ser interpretado como militado a qualquer proteína ou doença específica.

[0066] O termo "peptídeo beta amiloide" é sinônimo de "peptídeo β -amiloide", " β AP", " β A" e "A β ". Todos esses termos referem-se a um peptídeo formador de amiloide derivado da proteína precursora de amiloide humana (hAPP).

[0067] Um fago, proteína, proteína de fusão, domínio de proteína de fusão, ou um mutante, fragmento, ou variante do anterior que "se liga à fibrilas amiloides" ou que está "se ligando ao amiloide" é um que é positivo em um ensaio de ligação de amiloide. A ligação ao amiloide pode ser detectada *in vitro* usando um ensaio de ligação direta, tal como ressonância plasmônica de superfície (SPR), em cujo caso irá se ligar ao amiloide com um Kd de pelo menos 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, ou 10^{-11} M. Alternativamente, a ligação ao amiloide pode ser detectada usando o ensaio de ligação ao fA β 42 descrito nos exemplos. Fragmentos de ligação a amiloide, variantes e mutante da g3p também podem ser identificados por sua co-localização ao amiloide, quando injetado em um modelo de camundongo transgênico de qualquer doença por dobramento errado de proteína.

[0068] Qualquer um dos produtos ou composições da invenção descrito como "desagregante" ou "mediando a desagregação" reduz os agregados que já se formaram. A desagregação pode ser medida pelo ensaio de aprisionamento em filtro. Wanker et al., Methods Enzymol (1999) 309:375-86. O ensaio de aprisionamento em filtro é descrito neste documento e pode ser usado para detectar agregados e para monitorar a desagregação mediada pelas composições da invenção. A desagregação é detectada como retenção decrescente de amiloide no filtro, conforme mostrado por uma diminuição na coloração, na presença de concentrações crescentes do agente desagregante.

[0069] Conforme usado aqui, uma composição que "reduz amiloide" faz um ou mais dos seguintes: inibe a formação de amiloide, causa a desagregação de amiloide, promove a depuração de amiloide, inibe a agregação de amiloide, bloqueia e/ou evita a formação de oligômeros de amiloide tóxicos, e/ou promove a depuração de oligômeros de amiloide tóxicos.

[0070] Qualquer um dos produtos ou composições da invenção descritos como "protegendo os neurônios do dano por amiloide" evita o acúmulo do novo amiloide e/ou evita a formação de oligômeros de amiloide tóxicos. Os produtos ou composições da invenção descritos como "protegendo os neurônios do dano por amiloide" podem ser tomados profilaticamente. A proteção ou não dos neurônios contra o dano por amiloide por um produto ou composição pode ser medida pelo ensaio de citotoxicidade de cultura de células neuronais descrito neste documento.

[0071] Conforme usado neste documento, "proteína PrP", "PrP" e "príon" referem-se a polipeptídeos que são capazes de, sob condições apropriadas, induzir a formação de agregados responsáveis pelas doenças por dobramento errado de proteína. Por exemplo, a proteína

do príon celular normal (PrP^c) é convertida sob essas condições na isoforma de tremor epizootico scrapie correspondente (PrP^{Sc}) que é responsável por doenças, tais como, mas não limitadas a, encefalopatia espongiforme bovina (BSE) ou doença da vaca louca, encefalopatia espongiforme felina de gatos, kuru, doença de Creutzfeldt - Jakob (CJD), doença de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) e insônia familiar fatal (FFI).

[0072] O termo "variante", conforme usado neste documento, em conjunto com um bacteriófago, proteína, sequência de polipeptídeo ou de aminoácidos (por exemplo, uma variante de g3p ou uma variante de um fragmento de ligação a amiloide da g3p), refere-se a uma substância correspondente que contém pelo menos uma diferença de aminoácido (substituição, inserção ou deleção), em comparação com a substância de referência. Em determinadas modalidades, uma "variante" tem alta homologia de sequência de aminoácidos e/ou substituições de aminoácido conservativas, deleções e/ou inserções em comparação à sequência de referência. Em algumas modalidades, uma variante não tem mais do que 75, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 diferenças de aminoácidos em comparação à sequência de referência. Uma "substituição conservativa" refere-se à substituição de um primeiro aminoácido por um segundo aminoácido que não altera substancialmente as propriedades químicas, físicas e/ou funcionais da proteína g3p ou do fragmento de ligação a amiloide da g3p (*por exemplo*, a proteína g3p ou fragmento de ligação a amiloide retém a mesma carga, estrutura, polaridade, hidrofobicidade/hidrofiliidade, e/ou preserva as funções, tais como a capacidade de reconhecer, se liga, e/ou reduzir o amiloide). Essas modificações de aminoácidos conservativas são baseadas na similaridade relativa dos substituintes da cadeia lateral de aminoácidos, por exemplo, sua hidrofobicidade, hidrofiliidade, carga,

tamanho e similares. Substituições conservativas exemplares que levam várias das características anteriores em consideração são bem conhecidas para aqueles versados na técnica e incluem: arginina e lisina; glutamato e aspartato; serina e treonina; glutamina e asparagina; e valina, leucina e isoleucina.

[0073] O termo "mutante" (por exemplo, "g3p mutante" ou "fragmento de ligação a amiloide mutante") refere-se a uma proteína que sofre mutação em um ou mais aminoácidos a fim de modular sua eficácia terapêutica ou diagnóstica. Em determinadas modalidades, um mutante contém uma substituição, deleção e/ou inserção em um aminoácido que é conhecido por interagir com o amiloide. Em outras modalidades, um mutante contém uma substituição, deleção e/ou inserção em um aminoácido que é um aminoácido conservado presente numa g3p do tipo selvagem ou num fragmento de ligação a amiloide da mesma. Em algumas modalidades, um mutante não tem mais do que 75, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 diferenças de aminoácidos em comparação à sequência de referência. Em algumas modalidades, as substituições de aminoácidos são substituições conservativas. Os termos "variante" e "mutante" são usados trocavelmente neste documento, exceto que uma "variante" é normalmente não recombinante na natureza, enquanto que um "mutante" é normalmente recombinante.

[0074] O termo "alta rigurosidade", conforme usado neste documento, inclui condições facilmente determinadas pelo versado na técnica com base, por exemplo, no comprimento do DNA. De forma geral, essas condições estão definidas em Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 ed. Vol. 1, pp. 1.101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), e incluem o uso de uma solução de pré-lavagem para os filtros de nitrocelulose 5X SSC, SDS 0,5%, 1,0 mM de EDTA (PH 8,0), condições de hibridização de 50% de

formamida, 6X SSC a 42°C (ou outra solução de hibridização semelhante, tal como a solução de Stark, em 50% de formamida a 42°C), e com lavagem em aproximadamente 68°C, 0,2X SSC, SDS 0,1%. O versado na técnica reconhecerá que a temperatura e a concentração de sal na solução de lavagem podem ser ajustadas conforme necessário, de acordo com fatores, tais como o comprimento da sonda.

[0075] O termo "rigorosidade moderada", conforme usado neste documento, inclui condições que podem ser facilmente determinadas por aqueles versados na técnica com base, por exemplo, no comprimento do DNA. As condições básicas são estabelecidas por Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed. Vol. 1, pp. 1.101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), e incluem o uso de uma solução de pré-lavagem para os filtros de nitrocelulose 5X SSC, SDS 0,5%, 1,0 mM de EDTA (pH 8,0), condições de hibridização de 50% de formamida, 6X SSC a 42°C (ou outra solução de hibridização semelhante, tal como a solução de Stark, em 50% de formamida a 42°C), e condições de lavagem de 60°C, 0,5X SSC, SDS 0,1%.

[0076] O termo "alta homologia de sequência" significa pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, no mínimo, 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de homologia de sequência de aminoácidos com a sequência de referência, conforme medido usando programas de computador conhecidos, tais como o programa Bestfit.

[0077] Uma "proteína de fusão" é uma proteína de ocorrência não natural que compreende pelo menos dois domínios polipeptídicos.

[0078] Uma "proteína de fusão g3p" compreende uma proteína g3p ligada a um segundo domínio.

[0079] Uma "proteína de fusão N1-N2" (também denominada "proteína de fusão N1N2") compreende os domínios N1 e N2 (ou mutantes, fragmentos ou variantes destes), mas não o domínio N3/CT, de uma proteína g3p ligada a um segundo domínio. Uma proteína de fusão N1N2 pode ou não compreender a região de dobradiça.

[0080] Uma "proteína de fusão N2" compreende o domínio N2 (ou mutantes, fragmentos ou variantes de N2), mas não os domínios N1 nem N3/CT, de uma proteína g3p ligada a um segundo domínio. Uma proteína de fusão N2 pode ou não compreender a região de dobradiça.

[0081] Conforme usado neste documento, o "Construto 1" é derivado do M13 do tipo selvagem (vide, arquivo do Genbank: NC_003287.2, versão GI:56718463. No Construto 1, em comparação com o M13 do tipo selvagem, a Ser378(AGC) é alterada para Gly(GGC), e a Ile87 (ATT) é alterada para Asn(AAC)). O Construto 1 compreende os ácidos nucleicos da SEQ ID NO: 10.

[0082] O "Construto 2" é um isolado de M13 do tipo selvagem (GenBank JX412914.1). O Construto 2 compreende os ácidos nucleicos da SEQ ID NO:12.

[0083] O "Construto 3" é um fragmento da g3p solúvel recombinante que compreende os domínios N1 e N2 da g3p (rs-g3p(N1N2)) compreendendo os aminoácidos da SEQ ID NO:20.

[0084] O "Construto 4" é uma proteína de fusão Fc da IgG4 do fragmento da g3p solúvel recombinante (rs-g3p(N1N2)-hIgG4-Fc) que compreende os aminoácidos da SEQ ID NO:9. A região N1N2 do "Construto 4" é derivada da região N1N2 do "Construto 1".

[0085] O "Construto 5" é uma proteína de fusão Fc da IgG4 do fragmento da g3p solúvel recombinante (rs-g3p(N1N2)-hIgG4-Fc) que compreende os aminoácidos da SEQ ID NO:11. A região N1N2 do "Construto 5" é derivada da região N1N2 do "Construto 2".

[0086] O "Construto 6" é uma proteína de fusão Fc da IgG1 do

fragmento da g3p solúvel recombinante (rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc) que compreende os aminoácidos da SEQ ID NO:13. A região N1N2 do "Construto 6" é derivada da região N1N2 do "Construto 2".

Fontes de g3p

[0087] Bacteriófagos filamentosos são um grupo de vírus relacionados que infectam bactérias gram-negativas, tais como, por exemplo, *E. coli*. Vide, por exemplo, Rasched and Oberer, *Microbiology Reviews* (1986) Dec:401-427. Exemplos de bacteriófagos filamentosos incluem, mas não estão limitados a, o fago da família Ff (*isto é*, pelo menos M13, f1 e fd) e o fago da família I (*isto é*, pelo menos I22, Ike, If1).

[0088] Todos os bacteriófagos filamentosos de ocorrência natural contêm g3p como uma proteína de revestimento menor presente em 3 a 5 cópias por fago. Assim, em um aspecto da invenção, uma g3p isolada é obtida a partir de qualquer bacteriófago filamentoso de ocorrência natural. As formas recombinantes da g3p também podem ser produzidas. A g3p recombinante pode corresponder a uma g3p do tipo selvagem de qualquer bacteriófago filamentoso de ocorrência natural. Assim, a g3p isolada, recombinante, também é englobada pela invenção.

[0089] Um exemplo de g3p, do fago M13, é apresentado na SEQ ID NO: 1. A menos que claramente especificado em contrário, quaisquer mutações da g3p descritas estão na referência à SEQ ID NO: 1 mostrada abaixo, de forma limpa e anotada:

```

1   AETVESCLAK PHTENSFTNV WKDDKTLDRY ANYEGCLWNA TGVVVCTGDE TQCYGTWVPI
61  GLAIPENEGG GSEGGGSEGG GSEGGGTPKP EYGDTPIPGY TYINPLDGTY PPGTEQNPNAN
121 PNPSLEESQP LNTFMFQNNR FRNRQGALT VYGTVTQGTD PVKTYQYQTP VSSKAMYDAY
181 WNGKFRDCAF HSGFNEDPFV CEYQGQSSDL PQPPVNAGGG SGGGSGGGSE GGGSEGGGSE
241 GGGSEGGGSG GSGSGGDFDY EKMANANKGA MTENADENAL QSDAKGKLDS VATDYGAAID
301 GFIGDVSGLA NGNGATGDFA GSNSQMAQVG DGDNSPLMNN FRQYLPSLPQ SVECRPFVFS
361 AGKPYEFSID CDKINLFRGV FAFLLYVATF MYVFSTFANI LRNKES

```

SEQ ID NO:1 anotada

1 AETVESCLAK PHTENSFTNV WKDDKTLDYR ANYEGCLWNA TGVVVCTGDE TQCYGTWVPI

61 GLAIPENEGG GSEGGG**SEGG GSEGGG**TKPP EYGDTPIPGY TYINPLDGY PPGTEQNPAN

121 **PNPSLEESQP LNTFMFQNNR FRNRQGALTV YTGTVTQGTD PVKTTYQYTP VSSKAMYDAY**

181 **WNGKFRDCAF HSGFNEDPFV CEYQGQSSDL PQPPVNA**GGG SGGSGGGSE GGGSEGGGSE

241 GGGSEGGGSG GSGSGGDFDY EKMANANKGA MTENADENAL QSDAKGKLDS VATDYGAAID

301 GFIGDVSGLA NGNGATGDFA GSNSQMAQVG DGDNSPLMNN FRQYLPSLPQ SVECRPFVFS

361 AGKPYEFSID CDKINLFRGV FAFLLYVATF MYVFSTFANI LRNKES

Tabela 1 - Legenda para a SEQ ID NO:1 anotada

<u>Região</u>	<u>Resíduos</u>	<u>Resíduo</u> <u>quando o</u> <u>peptídeo sinal</u> <u>está presente</u>	<u>Legenda</u>
N1	1-67	19-85	sublinhado
G1	68-86	86-104	destaque
N2	87-217	105-235	sublinhado e negrito
G2	218-256	236-274	itálico
N3	257-406	275-424	destaque e sublinhado

A SEQ ID NO: 1 é GenBank NP-510891.1 com o peptídeo sinal do aminoácido 18 removido, assim a numeração de aminoácido é para a g3p madura. O peptídeo sinal é geralmente incluído em qualquer construto de expressão, e a g3p imatura que inclui o peptídeo sinal está incluída dentro do escopo das diversas modalidades da invenção, a menos que o contexto deixe claro de que está expressamente excluída. A SEQ ID NO: 1 é fornecida apenas como uma sequência de referência. Não se pretende de forma alguma limitar a invenção.

[0090] Sequências de g3p de várias fontes são conhecidas. Sequências de aminoácidos g3p exemplificativas para bacteriófago da família Ff incluem aquelas sequências encontradas em números de adesão UniProt P69169 (fago f1), P03661 (phage fd) e P69168 (do

fago m13). Sequências de aminoácidos g3p exemplificativas para bacteriófago da família I incluem P15415 (fago I22), P03663 (fago Ike) e O80297 (fago If1). Alinhamentos de várias sequências de g3p são apresentados em **Fig. 2**.

[0091] G3p útil para esta invenção também inclui fragmentos, mutantes, e/ou variantes de g3p. Mutantes ou variantes podem ser descritos tendo como referência um comprimento total de g3p ou com referência a um fragmento de g3p. Qualquer comprimento ou fragmenta g3p completo, incluindo mutantes e/ou variantes destes que mantenham a capacidade de ligar a amiloide, independentemente da sua habilidade de desagregar amiloide está no escopo da presente invenção. Qualquer proteína "compreendendo" tal g3p também é abrangida pela presente invenção. Da mesma forma, as proteínas "incluindo", "constituído de," "consiste essencialmente em", ou "tendo" tal g3p é também abrangida.

Ligação amiloide e amiloide desagregando fragmentos de g3p

[0092] Como mencionado, g3p tem dois domínios amino-terminal, N1 e N2, que interagem para formar um complexo N1-N2, e um domínio de carboxi-terminal, N3 (também chamado de "CT"). No fago Ff, o domínio de N1 compreende resíduos 1-67 e domínio do N2 compreende resíduos 87-217 da g3p maduro. Resíduos 87-123 formam a dobradiça que permite a abertura e fechamento entre N1 e N2. Às vezes a dobradiça é considerada parte do N2, considerando que, em outros casos, ela é tratada como um elemento separado. N1 e N2 são também ligadas por sequência ligante flexível rica em glicina. N1, existem duas pontes de dissulfeto entre Cys7 e Cys36 e entre Cys46 e Cys53. Há uma ponte de dissulfeto simples em N2 entre Cys188 e Cys201. O domínio de N3/CT é composto por resíduos 257 a 406. Hollinger, 1999; Marvin, 1998. No domínio carbóxi-terminal, há uma ponte de dissulfeto entre Cys354 e Cys371. Marvin, 1998. Não há

nenhuma ponte de dissulfeto entre domínios em g3p.

[0093] Exemplos não limitativos de ligação amiloide g3p incluem o domínio de N2 com a dobradiça (*por exemplo*, pelo menos resíduos 87-217 da SEQ ID NO: 1) ou sem a dobradiça (*por exemplo*, pelo menos resíduos 124-217 da SEQ ID NO: 1); e os domínios de N1-N2 (*por exemplo*, pelo menos resíduos 1-67 e 87-217 da SEQ ID NO: 1), com ou sem a sequência do ligante intermediário (*por exemplo*, com ou sem resíduos 68-86 da SEQ ID NO: 1) e com ou sem a dobradiça. Em qualquer dos exemplos anteriores, os fragmentos de N2 ou N1N2 podem ser o N2 ou N1N2 encontrados em um bacteriófago filamentosos do tipo selvagem ou uma recombinação N2 ou N1N2. Em qualquer dos exemplos anteriores, os fragmentos de N2 ou N1N2 podem ser variantes da sequência de tipo selvagem de bacteriófagos filamentosos.

[0094] Fragmentos de ligação amiloide útil de g3p incluem qualquer fragmento de g3p, incluindo fragmentos de N2 e N1N2 que mantêm a capacidade de ligar a amiloide, independentemente da capacidade do fragmento para desagregar a amiloide. Qualquer proteína "compreendendo" tal fragmento de ligação amiloide (ou variante da mesma) é abrangida pela presente invenção. Da mesma forma, as proteínas "incluindo", "constituído de," "consiste essencialmente em", ou "tendo" tal g3p é também abrangida.

N2 e N2 variantes e variantes polipeptídicas

[0095] Alinhamento da estrutura primária de N2 de: fd, f1, M13, I2-2 e If1 é mostrado como **Fig. 26**. Os aminoácidos de fd são mostrados em SEQ ID: 14; f1 em SEQ ID: 15; M13 na SEQ ID:16; I2-2 em SEQ ID NO: 17; I2-2 em SEQ ID 18; e If1 em SEQ ID NO: 19. Usando este alinhamento e figura como orientação, uma modalidade da invenção abrange um polipeptídeo N2, variantes de polipeptídeo de N2 e variantes de polipeptídeo de N2, compreendendo os aminoácidos

do SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18 ou 19, incluindo quaisquer fragmentos de ligação amiloide dos mesmos.

[0096] Em outras modalidades, o polipeptídeo de N2 é um mutante de polipeptídeo de N2 ou variante que mantém sua capacidade de ligar a amiloide e tem uma sequência de aminoácidos que consiste em não mais de 75, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 aminoácido diferenças quando alinhado com a sequência de aminoácidos de qualquer um dos SEQ ID não: 14, 15, 16, 17, 18 ou 19. Na **Fig. 26**, um asterisco "*" indica as posições que têm um resíduo simples, totalmente conservado. Dois pontos ":" indica a conservação entre grupos de propriedades fortemente similares que marcou maior do que 0,5 na matriz Gonnet PAM 250. Um ponto "." indica a conservação entre os grupos de propriedades fracamente semelhantes que marcou igual ou inferior a 0,5 na matriz Gonnet PAM 250. Em alguns aspectos dessas modalidades, o mutante de polipeptídeo de N2 ou variante não compreende uma diferença de aminoácidos em qualquer posição indicada com um "*" na **Fig. 26**. Em aspectos mais específicos, o mutante de polipeptídeo de N2 ou variante não compreende uma diferença de aminoácidos em qualquer posição indicada com um "*" e compreende o mesmo aminoácido pelo menos um de SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18 ou 19 em cada posição indicada com um ":" na **Fig. 26**. Em aspectos mais específicos, o mutante de polipeptídeo de N2 ou variante não compreende uma diferença de aminoácidos em qualquer posição indicada com um "*" e compreende o mesmo aminoácido pelo menos um de SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18 ou 19 em cada posição indicada com um ":" e cada posição indicada com um "." na **Fig. 26**.

[0097] Em outras modalidades, uma variante do polipeptídeo N2 é descrito especificando um por cento uma similaridade de aminoácido por cento para SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18 ou 19 novamente com a

ressalva de que a variante de polipeptídeo N2 liga amiloide. Nestas modalidades, a identidade das ações de polipeptídeos N2 pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% de identidade ao longo das sequências de aminoácidos de referência mostradas na SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18 ou 19.

[0098] Em outras modalidades, um polipeptídeo de N2, é descrito pela especificação de um por cento de similaridade de aminoácidos para a região de N2 de SEQ ID NO: 1, com a ressalva de que a variante de polipeptídeo N2 liga amiloide. Nestas modalidades, as partes variantes de polipeptídeo N2 pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% de identidade sobre a região de N2 de SEQ ID NO: 1.

[0099] Em outras modalidades, ainda, um polipeptídeo N2 é descrito pela estrutura secundária ou terciária. É conhecido que fd-N2 e domínios If1-N2 usam partes homólogas de suas superfícies para ligar ao mesmo sítio sobre o F-pilus em *E. coli*. Lorenz et al., J Mol Biol. 405:989-1003 (2011) em, por exemplo, 990. Os resíduos de aminoácidos e estrutura secundária e terciária que medeiam a ligação de N2 a F-pilus também medeiam a ligação de N2 de amiloide. Assim, resíduos de aminoácidos e estruturas secundárias e terciárias que são críticas para N2 para ligação F-pilus são também vitais para a ligação de N2-amiloide. Variantes de polipeptídeo N2 compreendendo os aminoácidos necessários para manter a estrutura secundária e

terciária, na região de ligação do N2-F-pilus estão dentro do escopo da presente invenção.

N2 e N2 mutantes e variantes polipeptídicas

[00100] Um alinhamento de estrutura primária de fd, f1 e M13 é mostrado como **Fig. 2A** e lke, l2-2 e lf1 como **Fig. 2B**. Usando este alinhamento como orientação, uma modalidade da invenção compreende um polipeptídeo N1N2, mutante polipeptídeo ou variante de polipeptídeo composto por aminoácidos que são conservados entre fd, f1 e M13 ou entre l2-2, lde e lf1, conforme identificado com referência as sequências de **Fig. 2**. Em outras modalidades, o polipeptídeo de N2 é um mutante de polipeptídeo de N2 ou variante que mantém sua capacidade de ligar a amiloide e tem uma sequência de aminoácidos que consiste em não mais de 75, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 as diferenças entre aminoácidos, quando alinhados com a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NO: 1, 2, 3, 5 ou 6.

[00101] Em outras modalidades, um polipeptídeo N1N2, mutante ou variante é descrito pela especificação de um por cento de similaridade de aminoácidos para a região de N1N2 de SEQ ID NO: 1, com a ressalva de que a variante de polipeptídeo N1N2 liga amiloide. Nestas modalidades, as partes de polipeptídeo variante N1N2 pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% de identidade ao longo regiões N1 e N2 de SEQ ID NO: 1.

Proteínas de fusão

[00102] Em um aspecto, a invenção refere-se às proteínas de fusão. A proteína de fusão compreende g3p, um fragmento de ligação

amiloide de g3p, uma molécula de ligação TolA ou um inibidor de TolA. Proteínas de fusão compreendendo mutante ou variante g3p ou g3p fragmentos são totalmente abrangentes. A proteína de fusão é ligada, fundida, conjugada, acoplada ou associada com/a pelo menos uma proteína adicional ou domínio da proteína com a qual não está normalmente associada. Em uma modalidade, a proteína de fusão é uma proteína de fusão g3p que compõe uma proteína g3p ligada a um segundo domínio. Em outra modalidade, a proteína de fusão é um fragmento de ligação amiloide de uma proteína g3p ligada a um domínio de segundo. Em outra modalidade, a proteína de fusão é uma proteína de fusão N1N2, que compreende os domínios de N1 e N2, mas não o domínio de CT, de uma proteína de g3p. Em ainda outra modalidade, a proteína de fusão é uma proteína de fusão de N2, a qual compreende o domínio de N2, mas nem os domínios N1 nem CT, de uma proteína g3p. Como observado, alguns aspectos da invenção referem-se à proteína g3p mutante ou variável ou fragmentos de ligação amiloide da mesma e para mutante ou variante N1N2 ou N2 domínios que ligam as fibras amiloides. Assim, as proteínas de fusão que compreendem estas formas mutantes ou variantes também são parte da invenção.

[00103] A g3 e o fragmento de ligação amiloide e o polipeptídeo de parceiro de fusão podem ser parte de uma sequência de aminoácidos contínua com o parceiro de fusão polipeptídeo ligado diretamente ou através de um ligante de peptídeo curto para o N-terminal ou o C-terminal de g3p ou fragmento do polipeptídeo de ligação amiloide. Em tais casos, a g3p amiloide ou seu fragmento de ligação e o parceiro de fusão polipeptídeo pode ser traduzido como um polipeptídeo único a partir de uma sequência de codificação que codifica tanto a g3p amiloide quanto o seu fragmento de ligação e o parceiro de fusão polipeptídeo.

[00104] Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende uma região constante de imunoglobulina como o segundo domínio. As proteínas de fusão constituídas por regiões constantes de imunoglobulinas ligadas a uma proteína de interesse ou seu fragmento, foram descritos (*vide, por exemplo*, Patente U.S. Nos. 5.480.981 e 5.808.029; Gascoigne et al. 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:2936; Capon et al. 1989, *Nature* 337:525; Traunecker et al. 1989, *Nature* 339:68; Zettmeissl et al. 1990, *DNA Cell Biol. USA* 9:347; Byrn et al. 1990, *Nature* 344:667; Watson et al. 1990, *J. Cell. Biol.* 110:2221; Watson et al. 1991, *Nature* 349:164; Aruffo et al. 1990, *Cell* 61:1303; Linsley et al. 1991, *J. Exp. Med.* 173:721; Linsley et al. 1991, *J. Exp. Med.* 174:561; Stamenkovic et al., 1991, *Cell* 66:1133; Ashkenazi et al. 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10535; Lesslauer et al. 1991, *Eur. J. Immunol.* 27:2883; Peppel et al. 1991, *J. Exp. Med.* 174:1483; Bennett et al. 1991, *J. Biol. Chem.* 266:23060; Kurschner et al. 1992, *J. Biol. Chem.* 267:9354; Chalupny et al. 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10360; Ridgway and Gorman, 1991, *J. Cell. Biol.* 115, Abstract No. 1448; Zheng et al. 1995, *J. Immun.* 154:5590). Estas moléculas geralmente possuem tanto a atividade biológica associada à molécula ligada de interesse, bem como a função efetora ou alguma outra característica desejada associada com a região de constante imunoglobulina (*por exemplo*, estabilidade biológica, secreção celular).

[00105] Em algumas modalidades, a proteína de fusão compreende um fragmento Fc de uma região constante de imunoglobulina. Cassetes de expressão Fc podem ser adquiridos comercialmente. O fragmento Fc pode ser composto de domínios CH2 e CH3 de uma imunoglobulina e a região de dobradiça de imunoglobulina. O fragmento Fc pode ser o fragmento Fc de uma IgG1, um IgG2, um IgG3 ou um IgG4. Em uma modalidade específica, a porção de uma região constante de imunoglobulina é um fragmento Fc de uma IgG1.

Em outra modalidade, a porção de uma região constante de imunoglobulina é um fragmento Fc de uma IgG4. Em ainda outra modalidade, a porção de uma região constante de imunoglobulina é um fragmento Fc de uma IgM.

[00106] Assim, em uma modalidade, uma g3p solúvel recombinante ou fragmento de ligação amiloide é fundido a um domínio de Fc de imunoglobulinas usando técnicas-padrão de biologia molecular. A g3p solúvel recombinante ou fragmento de ligação amiloide pode ser mutante ou variante. Por exemplo, um fragmento de ligação amiloide da g3p, tais como o domínio N1N2 ou o domínio de N2, pode ser clonado em fusão de vetor de expressão IgGFc. Vetores de fusão exemplares IgGFc incluem, por exemplo, um dos vetores pFUSE-Fc disponíveis a partir do InvivoGen. Em algumas modalidades, o bivalente resultante (*por exemplo*, g3p (N1N2)-IgGFc ou g3p (N2)-IgGFc proteína de fusão terá maior avides para ligação amiloide que o recombinante solúvel g3p uma vez que é agora bivalente.

[00107] Em outras modalidades, a proteína de fusão é composta por uma proteína não Fc ligada a uma g3p ou fragmento de ligação amiloide de g3p.

[00108] Em outras modalidades, a proteína de fusão compreende pelo menos dois polipeptídeos g3p ou fragmentos de ligação destes amiloides. Em outras modalidades, a proteína de fusão é composta por três ou mais polipeptídeos g3p ou fragmentos de ligação destes amiloides. Em outras modalidades, a proteína de fusão compreende cinco g3p polipeptídeos ou fragmentos de ligação destes amiloides. Essas proteínas de fusão dimérica e multiméricas fornecem maiores interações avides desde que incluem mais de uma g3p ou fragmentos de ligação destes amiloides.

[00109] Em outras modalidades, a proteína de fusão é composta por albumina. Vide, por exemplo, Patente US N° 6.686.179 para Fleeer.

[00110] Em todas as instâncias, o fragmento de ligação g3p ou amiloide da g3p da proteína de fusão abrange os mutantes e respectivas variantes.

[00111] Em geral, as proteínas de fusão ligar a amiloide pelo menos tão eficazmente como o correspondente g3p desligado ou fragmento da respectiva g3p. Quando aplicável, as proteínas de fusão são pelo menos tão eficazes em mediando a desagregação de amiloide, promover o afastamento de amiloide, inibindo a agregação de amiloide, e/ou removendo ou impedindo a formação de oligômeros tóxicos como o correspondente g3p desligado ou seu fragmento. Em algumas modalidades, a proteína de fusão liga a amiloide e é pelo menos tão eficaz na medição da desagregação de amiloide, promovendo o afastamento amiloide, inibindo a agregação de amiloide, e/ou removendo ou impedindo a formação de oligômeros tóxicos como é um recombinante, solúvel g3p compreendendo SEQ ID NO: 1. Em outras modalidades, ainda, a proteína de fusão liga amiloide e é pelo menos tão eficaz em medição da desagregação de amiloide, promover o afastamento amiloide, inibindo a agregação de amiloide, e/ou removendo ou impedindo a formação de oligômeros tóxicos como fago M13. Em ainda outras modalidades, a proteína de fusão liga a amiloide e é pelo menos tão eficaz na medição da desagregação de amiloide, promovendo o afastamento amiloide, inibindo a agregação de amiloide, e/ou removendo ou impedindo a formação de oligômeros tóxicos do fago M13. Em algumas modalidades, a proteína de fusão se liga a amiloide e é pelo menos tão eficaz na redução de amiloide em doenças como o enrolamento incorreto da proteína do fago M13. Em ainda outras modalidades, a proteína de fusão se liga a amiloide e é mais eficaz na redução de amiloide em doenças como o enrolamento incorreto da proteína do fago M13. Em ainda outras modalidades, a proteína se liga a amiloide

e é pelo menos ou mais eficaz na prevenção da formação de amiloide como fago M13.

[00112] Proteínas de fusão podem ser sintetizadas usando técnicas bem-conhecidas na técnica. Por exemplo, as proteínas da fusão da invenção podem ser sintetizadas recombinantes em células (*vide, por exemplo*, Sambrook et al. 1989, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. e Ausubel et al. 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.). Alternativamente, as proteínas da fusão da invenção podem ser sintetizadas usando métodos sintéticos conhecidos como síntese de fase sólida. Técnicas sintéticas são bem conhecidas na técnica (*vide, por exemplo*, Merrifield, 1973, *Chemical Polypeptides*, (Katsoyannis e Panayotis eds.)) pp. 335-61; Merrifield 1963, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149; Davis et al. 1985, *Biochem. Intl.* 10:394; Finn et al. 1976, *The Proteins* (3d ed.) 2:105; Erikson et al. 1976, *The Proteins* (3d ed.) 2:257; Patente US n ° 3.941.763. Alternativamente, a construção final pode partilhar essencialmente a mesma função que uma proteína de fusão produzida de forma recombinante, mas simplesmente ser produzida usando técnicas de não recombinantes, tais como a ligação química. Componentes das proteínas de fusão podem ser preparadas usando o mesmo método geral descrito para a expressão g3p e mutações g3p.

[00113] Em algumas modalidades, o fragmento de ligação g3p ou amiloide (ou forma mutante ou variante) pode ser fundido com uma sequência de marcador, tal como um peptídeo que facilita a purificação do polipeptídeo fundido (por si só ou em adição à fusão de uma outra proteína ou incorporação de uma molécula transportadora). A sequência de ácido amino marcador pode ser um peptídeo hexa-histidina tal como a etiqueta fornecida em um vetor de pQE (Qiagen, Mississauga, Ontário, Canadá), entre outros, muitos dos quais estão

disponíveis comercialmente. Conforme descrito na Gentz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1989)86:821-824, por exemplo, hexa-histidina fornece para conveniente purificação da proteína de fusão. Outra marca de peptídeo útil para a purificação, a marca de hemaglutinina (HA), corresponde a um epítipo derivado da proteína HA de gripe. (Wilson et al., (1984) *Cell* 37:767).

Fago de superexpressão g3p

[00114] Em outro aspecto, a invenção se relaciona com bacteriófago modificado para aumentar o número de cópias da g3p expressado por fago a mais de 3 a 5 exemplares encontrados tipicamente em bacteriófagos filamentosos de tipo selvagem. Em uma modalidade, o fago que expressa números elevados de g3p pode ser selecionado a partir de variantes que ocorrem naturalmente. Em outra modalidade, técnicas de recombinação são usadas para aumentar o número de cópia de g3p.

[00115] Em algumas modalidades, um tipo selvagem de sequência de codificação g3p ou fragmentos g3p de ligação amiloide (incluindo mutantes ou suas variantes) pode ser usado para substituir um dos genes que codificam para uma outra proteína de revestimento do bacteriófago. Dependendo do gene do bacteriófago substituído, o número de g3p pode ser aumentado para 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 500, 1000, ou até mesmo quase 3000 cópias (por exemplo, se a sequência de codificação de gene 3 for usada para substituir a sequência de codificação de gene 8 ou for fundida para o final da sequência de codificação de gene 8).

[00116] Para produzir fago expressando cópias adicionais da g3p, uma sequência de codificação de g3p (ou forma mutante ou sua variante) é clonada, conforme descrito em outro lugar na descrição. A sequência de código g3p (ou mutante ou sua forma variante) pode então ser usado para substituir um outro gene de fago e expresso, se

necessário em conjunto com o fago auxiliar.

[00117] Alternativamente, em algumas modalidades da sequência de codificação g3p (ou mutante ou sua forma variante) é fundida na estrutura com a sequência codificadora de um outro gene de fago, com ou sem uma sequência interveniente "espaçador". Métodos de preparação de proteínas do fago para que outra proteína ou peptídeo seja "fundido" são bem- conhecidos na técnica de apresentação em fago e g3p ou um fragmento de ligação amiloide do mesmo pode ser "exibido" da mesma maneira como, por exemplo, antígenos ou cadeias de anticorpos. Por exemplo, Scott & Smith, Science (1990) 249:386-90; Devlin et al., Science (1990) 249:404-06. Quando a expressão de apenas um fragmento da g3p é desejada, a sequência de código para o fragmento (ou mutante ou sua forma variante) pode estar ligada ao outro gene para que dentre as sequências de ligante Ser/Gly naturais presentes em g3p serve como o ligante. Em algumas modalidades, apenas a sequência para N2 ou N1N2 domínios (ou mutante ou sua forma variante) de código é fundida em quadro para o outro gene.

Mutante G3P e fragmentos de ligação amiloide

[00118] Em outro aspecto, a invenção se relaciona com proteínas mutantes g3p e fragmentos de ligação amiloide mutante dos mesmos. As proteínas de fusão e de fagos compreendendo as proteínas g3p mutantes e fragmentos de ligação amiloide são também parte da invenção. Mutante g3p e fragmentos de ligação amiloide mutante dos mesmos podem ser produzidos ou selecionados, para propriedades que contribuem para a eficácia terapêutica das composições farmacêuticas descritas no presente pedido. Por exemplo, g3p ou fragmentos de ligação amiloide dos mesmos podem ser mutados recombinantes ou caso contrário selecionados para possuir uma ou mais das seguintes propriedades em relação a g3p de M13: maior afinidade para ligação amiloide, uma dobradiça reduzida T_M , aumentou

a avidéz (avidez, destacando-se da afinidade que avidez é usada para descrever a soma de ligação amiloide disponível todas onde uma g3p é composto por mais de um sítio de ligação amiloide), aumento da capacidade de desagregar agregados amiloides ou aumentou a capacidade de prevenir a agregação de fibrilas amiloides. Como alternativa, ou além disso, a g3p mutante ou mutantes fragmentos de amiloide dos mesmos podem incorporar outras propriedades úteis descritas em outros lugares na descrição.

[00119] Proteínas mutantes g3p podem ser produzidas por mutagênese do fago ou por técnicas de recombinação, tais como sítios baseados em PCR dirigido mutagênese ou mutagênese aleatória.

[00120] Em algumas modalidades, os mutantes com maior afinidade são produzidos por mutagênico M13 e selecionando fago em uma coluna de afinidade amiloide juntamente com condições rigorosas de lavagem. Rodadas sucessivas de ligação, lavagem, eluição e expansão do fago selecionado enriquece para aqueles fago com ligação de alta afinidade para amiloide. Uma vez maior afinidade da população do fago é conseguida usando a garimpar amiloide, clones individuais com alta afinidade são selecionados e analisados. Desta forma, os mutantes de fagos podem ser selecionados para ligação seguinte a mutagênese aleatória de alta afinidade.

[00121] G3p ou qualquer amiloide ligando fragmentos dos mesmos, (por exemplo, N1N2 domínios ou domínios de N2) também pode ser mutado usando técnicas de recombinação. Por exemplo, um vetor, como descrito neste documento transportando g3p ou um fragmento de ligação amiloide respectivo (por exemplo, N1N2 ou N2) pode ser uma mutação usando estratégias da mutagênese baseadas em PCR. A proteína codificada e mutante é então expressa e ligação amiloide e afinidade dos mutantes analisados como descrito.

[00122] Fragmentos de ligação amiloide mutante de g3p também

podem ser derivados de mutante g3p. Por exemplo, em mutação g3p e/ou selecionando para uma g3p mutante com propriedades desejáveis e em seguida, obter a desejada fragmento de ligação amiloide daí decorrente, por exemplo, por proteólise e purificação subsequente.

[00123] Triagem de fago tenda g3p mutante para maior afinidade de ligação amiloide, mudanças na temperatura-sensibilidade de ligação, etc., podem ser usadas para identificar o fago para posterior caracterização da g3p do que fago. Triagem para propriedades, tais como a sensibilidade da temperatura de ligação pode utilizar uma coluna de afinidade de amiloide com uma ou mais das etapas de ligação, de lavagem ou de eluição realizadas em uma forma dependente da temperatura.

[00124] Em algumas modalidades, a g3p mutante ou fragmento de ligação amiloide g3p liga amiloide com uma afinidade que é pelo menos 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500 ou mesmo 1000 maior do que a ligação da g3p não mutante correspondente ou fragmenta g3p de M13. Em outras modalidades, a g3p mutante ou fragmento de ligação amiloide g3p mantém ligação amiloide que é pelo menos 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, ou 99% tão forte quanto a ligação do correspondente não mutante g3p ou fragmenta g3p de M13 de ligação amiloide. Em algumas modalidades uma g3p mutante ou fragmento de ligação amiloide que exibe menor afinidade de ligação amiloide do formulário correspondente não mutante também possui outro biológico desejável (por exemplo, maior capacidade de desagregar amiloide; maior capacidade de prevenir a agregação de amiloides) ou propriedade de farmacêuticos (por exemplo, maior estabilidade metabólica, perfil farmacocinético favorável, maior solubilidade) que é melhorada em comparação com a forma não mutante correspondente. Ligação amiloide poderá ser

avaliada por ressonância de plasmon de superfície ou em um ELISA competitivo, conforme descrito nos exemplos.

[00125] Em algumas modalidades, variantes e/ou mutantes de g3p podem ser identificadas pela triagem de bibliotecas de DNA usando hibridização de M13 g3p para selecionar DNAs relacionados que hibridizam para M13 g3p sob condições de severidade moderada ou alta dureza.

[00126] Em algumas modalidades, um mutante g3p é uma g3p recombinante produzido ou fragmento de ligação amiloide respectivo que difere da proteína de g3p M13 madura (SEQ ID NO: 1) por pelo menos um resíduo de aminoácido, mas ainda se liga amiloide. Em algumas modalidades, mutações de ponto individuais são especificadas fornecendo o aminoácido do M13 g3p em um resíduo específico da proteína madura e o aminoácido de substituição desse resíduo. Por exemplo, "F194A" significa que a fenilalanina na posição 194 da sequência de M13 madura foi alterada para uma alanina. Em outras modalidades, uma g3p mutante é descrito pela especificação de um aminoácido por cento de similaridade com a SEQ ID NO: 1, novamente com a ressalva de que os mutantes g3p ligam amiloides. Nestas modalidades, as partes g3p mutantes pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% de identidade sobre o comprimento total de SEQ ID NO: 1. Nestas modalidades envolvendo um fragmento mutante amiloide ligação de g3p, as partes de ligação dos fragmentos amiloides mutantes pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89% , pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%,

pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou, pelo menos, 99 % de identidade ao longo de todo o comprimento do fragmento correspondente da SEQ ID NO: 1.

[00127] Como um assunto prático, se qualquer políptido em particular, pelo menos, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% idêntica à SEQ ID NO: 1 pode ser determinada convencionalmente usando programas de computador conhecidos, tal o programa Bestfit. Quando se utiliza Bestfit ou outro programa de alinhamento de sequências para determinar se uma sequência em particular é, por exemplo, 95% idêntica a uma sequência de referência de acordo com a presente invenção, os parâmetros são ajustados, naturalmente, que a porcentagem de identidade é calculada sobre o total comprimento da porção da sequência de aminoácido referência que é homóloga da sequência de pesquisa.

[00128] Em algumas modalidades dos vários aspectos, mutante g3p e fragmentos de ligação amiloide respectivas incluem sem mutações em um resíduo de aminoácido que é conservado entre g3p da família Ff, I-família ou tanto o Ff e I-famílias. Em outras modalidades, o mutante g3p e ligação amiloide respectivos fragmentos no máximo incluem mutações em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 resíduos de aminoácidos que são conservados entre g3p da família Ff, I-família ou tanto o Ff e I-famílias. Em ainda outras modalidades, os fragmentos de ligação do mutante e g3p amiloides dos mesmos incluem a maior parte das mutações de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 resíduos de aminoácidos que não são conservados entre g3p da família de FF, o I-família, ou ambos o Ff e I-famílias. Em ainda outra modalidade, o mutante g3p e fragmentos de ligação amiloide dos mesmos incluem no máximo mutações em 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 resíduos de

aminoácidos que não são conservados entre um ou mais dos I22, Ike e If1. Em ainda outras modalidades, o mutante g3p e fragmentos de ligação amiloide respectivos incluem no máximo mutações em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 resíduos de aminoácidos que não são conservados entre g3p da família Ff, I-família ou tanto o Ff e I-famílias. Em algumas modalidades, no máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 mutações estão localizadas dentro do domínio de N1. Em algumas modalidades, no máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 mutações estão localizadas dentro do domínio de N2. Em algumas modalidades, a no máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 mutações estão localizadas dentro do domínio N2 e não estão dentro da região de dobradiça.

[00129] Mutagênese sítio dirigida pode direcionar resíduos conhecidos por ser importante para a estabilidade da g3p, N1N2 ou o domínio de N2. Por exemplo, as mutações de substituição de alanina no D94 e T95; E115; N122; L125; E126 e E127; E127 e E128; Q129; Q145; T154 e T156; Q157; T159 e D160; K163 e T164; Y166; e E196 e D197 têm sido mostrados previamente para não afetar significativamente a ligação de fago F-pili, Deng & Perham de 2002. Por conseguinte, estas posições são tolerantes de mutação e uma mutação em uma ou mais destas posições pode aumentar ou têm um efeito neutro sobre a capacidade de ligação amiloide na g3p e fragmentos de ligação amiloide g3p da invenção. Assim, em algumas modalidades, a invenção inclui uma g3p ou fragmento de ligação amiloide g3p que é uma mutação em um ou mais de D94, T95, E115, N122, L125, E126, E127, E128, Q129, Q145, T154, T156, Q157, T159, D160, K163, T164, Y166, E196 ou D197 (em relação ao SEQ ID NO: 1). Em algumas modalidades, a mutação em um ou mais de D94, T95, E115, N122, L125, E126, E127, E128, Q129, Q145, T154, T156, Q157, T159, D160, K163, T164, Y166, E196 ou D197 não é exclusivamente uma mutação a alanina.

[00130] Mutações de substituição de alanina no F194; F190 e H191; K184, R186 e D187; R142 e R144 foram mostrados anteriormente para diminuir a ligação para F-pili, Deng & Perham, 2002. Assim, em algumas modalidades, uma mutação é escolhida a partir de uma mutação que não inclui um ou mais dos seguintes resíduos: R142, R144, W181, K184, R186, D187, F190, H191 ou F194 (numeração em relação a SEQ ID NO: 1). No entanto, a substituição de R142, R144, W181, K184, R186, D187, F190, H191 ou F194 com um resíduo não alanina pode aumentar a ligação amiloide. Assim, em uma modalidade, a mutação é uma mutação não alanina a um ou mais dos R142, R144, W181, K184, R186, D187, F190, H191 ou F194. Em uma modalidade, a mutação é uma mutação não alanina em F194. Em outra modalidade, a mutação é uma mutação não alanina a F190 e H191. Em outra modalidade, a mutação é uma mutação não alanina em K184, R186 e D187. Em outra modalidade, a mutação é uma mutação não alanina a W181. Em outra modalidade, a mutação é uma mutação não alanina em R142 e R144. Em determinadas modalidades, a mutação não é exclusivamente uma, algumas ou todas: T13I, T101I, Q129H, G153D, W181A, F190A, F194A e D209Y.

[00131] Em algumas modalidades, a mutação é em um ou mais resíduos existentes na superfície do domínio do N2, que é a parte da g3p que liga F-pili. Em uma modalidade, a mutação é em um ou mais resíduos, localizados na borda exterior do domínio do N2. Em outras modalidades, a mutação é em um ou mais resíduos existentes na superfície do domínio do N1, que é a parte da g3p que liga a TolA. Em uma modalidade, a mutação é em um ou mais resíduos, localizados na borda exterior do domínio de N1. Em outra modalidade, a mutação é em um ou mais resíduos de solventes acessíveis em g3p. Em outra modalidade, a mutação(s) desloca o *cis/trans* equilíbrio em Pro213 para mais de 50, 60, 70, 80, 90 ou 95% *trans*. Assim, em algumas

modalidades, a g3p é uma g3p mutante com um *cis /trans* equilíbrio no Pro213 que é pelo menos 50, pelo menos, 60, 70, pelo menos 80, pelo menos 90 ou pelo menos 95% *trans*.

[00132] Em algumas modalidades, o mutante de g3p amiloide ou fragmentos de ligação não incluem mutações nos resíduos estruturalmente conservados. Exemplos de resíduos estruturalmente conservados incluem os resíduos que, apesar de possíveis inserções de sequência, estão envolvidos no fornecimento de estrutura de domínio, tanto Ff e membros da I-família.

[00133] Em algumas modalidades, qualquer mutação feita preserva a ligação amiloide. Em outras modalidades, a mutação não substitui um resíduo prolina.

[00134] Em algumas modalidades, qualquer mutação feita preserva a ligação amiloide e não substitui um resíduo de cisteína. Em algumas modalidades, a mutação preserva todos, pelo menos um, pelo menos dois, pelo menos três ou quatro das pontes de dissulfeto encontradas dentro da g3p. Assim, em uma modalidade, qualquer mutação preserva as duas pontes de dissulfeto no N1 entre Cys7 e Cys36 e Cys46 e Cys53. Em outra modalidade, qualquer mutação preserva também, mas não ambos, das pontes dissulfeto de N1, entre Cys7 e Cys36 e Cys46 e Cys53. Em uma modalidade, é preservada a ponte de dissulfeto entre Cys188 e Cys201. Em algumas modalidades, cada uma das pontes de dissulfeto Cys7 e Cys36, Cys46 e Cys53 e Cys188 e Cys201 são preservadas. Em uma modalidade, as mutações preservam a ponte de dissulfeto entre Cys354 e Cys371. Em algumas modalidades, as mutações preservam as pontes de dissulfeto entre Cys7 e Cys36, Cys46 e Cys53, Cys188 e Cys201 e Cys354 e Cys371.

[00135] Em algumas modalidades, qualquer mutação feita preserva a ligação amiloide e diminui a temperatura de fusão (T_M) do N1N2. T_M pode ser medido usando qualquer um dos métodos descritos nos

exemplos. Mutantes que diminuem o T_M do N1N2 são esperados para expor melhor ligação para A β , inibir A β conjunto de uma maior extensão e deve ser pelo menos tão eficaz no ensaio de desagregação coma g3p de M13. Por conseguinte, tais mutantes, bem como proteínas da fusão e do fago compreendendo esses mutantes são esperados para ser pelo menos tão eficaz terapeuticamente como as correspondentes sequências no M13, suas proteínas da fusão e M13 intacta, respectivamente, no tratamento de um ou mais proteína de doença de dobramento errado.

[00136] Mutantes também podem ser projetados para incluir uma sequência de direcionamento. Tais sequências de direcionamento podem ser inseridas nas regiões de ligante flexível entre N1N2, ou entre N2 e outro domínio em uma proteína de fusão de N2. Sequências de direcionamento de localização nuclear (NLS) podem ser benéficas na doença de Huntington. Direcionamento do endossomo pode ser benéfico na doença de Parkinson.

[00137] Além de direcionamento a regiões específicas na célula, o direcionamento de sequências pode ser utilizado para direcionar os tipos diferentes de amiloide. Nucleação de sequências pode aumentar a afinidade e direcionar a proteína mutante para um amiloide particular. Outros mutantes podem ser preparados que incluem sequências peptídicas que são então hidrofóbicas que eles precipitam por conta própria. Por exemplo, várias sequências de AVVAI podem ser adicionadas a g3p e fragmentos de ligação amiloide respectivo (por exemplo, N2 e N1N2) e / ou suas proteínas de fusão para gerar proteínas quiméricas que melhoraram várias sequências de ligação. Alguns exemplos de peptídeos que ligam amiloide e podem ser incorporados às proteínas mutantes ou proteínas quiméricas compreendendo g3p, N2 e N1N2 e/ou suas proteínas da fusão são os inibidores de peptídeo com base em GxFxGxF (SEQ ID NO: 21) o

quadro descrito no Sato, Biochemistry (2006) 45:5503-16 e o KLVFF (SEQ ID NO: 22) peptide described in Tjernberg et al., J. Biol. Chem. (1996) 271:8545-48. Outras partes de direcionamentos são conhecidos e também podem ser usados no presente invenção. Vide, por exemplo, Sciarretta et al., Methods in Enzymology (2006) 413:273-

312. Veículos e veículos de exibição de ligação amiloide

[00138] Em um outro aspecto da invenção g3p e fragmentos dos mesmos (incluindo mutantes e variantes de qualquer um dos anteriores), incluindo, mas não limitado a domínios N1N2 e domínios N2, assim como moléculas, polipeptídeos e proteínas de fusão que eles compreendem podem ser de ligação amiloide combinada com outros veículos orgânicos ou inorgânicos, que fornecem andaimes moleculares que preservam a ligação amiloide, mas fornecem recursos adicionais.

[00139] Em algumas modalidades, o fragmento de ligação g3p ou amiloide ou proteína de fusão g3p e a transportadora estão covalentemente ligados através de meios não recombinantes, tais como, por exemplo, uma ligação química que não seja uma ligação peptídica. Pode ser utilizado qualquer reticulante químico adequado. Também podem ser utilizados quaisquer métodos conhecidos da ligação covalente de polipeptídeos a outras moléculas (por exemplo, transportadoras). Em algumas modalidades, a g3p amiloide ou fragmentos de ligação ou proteína de fusão g3p e o veículo pode ser fundido através de um ligante que é composto de pelo menos um aminoácido ou porção química.

[00140] Em algumas modalidades, o fragmento de ligação g3p ou amiloide ou proteína de fusão g3p e o veículo não estão covalentemente ligados. Em algumas dessas modalidades, eles podem estar ligados, por exemplo, usando pares de ligação. Exemplos de pares de ligação incluem, mas não estão limitados a, biotina e

avidina ou estreptavidina, um anticorpo e o seu antígeno, etc.

[00141] Os exemplos de veículos incluem, mas não estão limitados a, partículas virais (incluindo fagos, vide baixo) no qual uma proteína g3p amiloide ou fragmentos de ligação não nativos para o vírus é incorporado como parte da estrutura viral; polímeros de ocorrência natural, sintética ou mista; estruturas revestidas com polímeros, tais como esferas (incluindo grânulos superficiais derivados); poliaminoácidos, ácidos nucleicos e lipossomas. O veículo pode estar ligado direta ou indiretamente aa g3p ou fragmento de ligação amiloide. Dependendo do veículo, ligações intermediárias podem ser usadas para fornecer espaçamento adequado entre o veículo e o domínio de ligação amiloide.

[00142] Um poliaminoácido pode ser uma proteína transportadora. Tais poliaminoácidos podem ser escolhidos do álbum de soro (tais como HSA), um anticorpo adicional ou parte do mesmo, por exemplo, a região Fc, fetuin A, fetuin B, fecho de leucina de fator nuclear eritroide derivado-2 (NFE2), fecho de leucina neurorretinal, tetranectina ou outros poliaminoácidos, por exemplo, lisinas. O local de fixação do poliaminoácido pode ser no N terminal ou C terminal ou outros lugares no meio e também podem ser ligados por uma porção ligante química para G3P amiloide ou seu fragmento de ligação.

[00143] Em algumas modalidades, os veículos incluem moléculas com os domínios de oligomerização. Oligomerização oferece vantagens funcionais, quando uma das funções de uma proteína ou um de seu fragmento de ligação é, incluindo multivalência, o aumento da força de ligação e a função combinada de diferentes domínios. Esses recursos são vistos em proteínas naturais e também podem ser introduzidos por engenharia de proteínas. Nesse sentido, a invenção também proporciona fragmentos de ligação e g3p amiloides (incluindo mutantes e suas variantes), tais como o domínio N1N2 e domínio de

N2, que compreende um domínio de oligomerização, por exemplo, um domínio de dimerização. Domínios de oligomerização adequados incluem os domínios em espiral espiralada, incluindo os domínios em espiral espiralada alfa-helicoidal; domínios de colágeno; domínios como colágeno e domínios de imunoglobulina diméricas. Parceiros de fusão de polipeptídeo adequados em espiral enrolada da invenção incluem tetranectina domínio de filamento helicoidal, o domínio de filamento helicoidal de cartilagem oligomérico da proteína de matriz; domínios de angiopoietina em espiral espiralada e leucina domínios de fecho. Quando os domínios de colágeno ou de similar a colágeno são usados, eles podem compreender, por exemplo, os encontrados nos colágenos, manose lectina de ligação, as proteínas surfactantes dos pulmões A e D, de adiponectina, ficolin, congulinina, receptores de macrófagos scavenger e emilin. Enquanto alguns desses domínios podem ser incorporados como proteínas da fusão, em muitas modalidades eles são não recombinantes ligados a g3p, N1N2 domínio, domínio de N2 ou outros fragmentos de ligação de amiloide, por exemplo, através de ligação covalente.

[00144] Além disso, a invenção fornece g3p ou fragmentos de ligação de amiloide do mesmo ou proteínas da fusão g3p, ligadas a um polímero. Polímeros empregados na invenção serão farmacêuticamente aceitáveis para a preparação de um produto terapêutico ou composição.

[00145] Polímeros normalmente estão ligados a um fragmento de ligação g3p ou amiloide com consideração dos efeitos sobre domínios funcionais ou antigênicos do polipeptídeo. Em geral, a derivatização química pode ser realizada sob qualquer condição apropriada usada para reagir a uma proteína com uma molécula de polímero ativado. Grupos de ativação, que podem ser usados para ligar o polímero para as partes ativas que incluem sulfona, maleimida, sulfidril, tiol, triflato,

tresilato, azidirina, oxirano e 5-piridila.

[00146] Adequado, clinicamente aceitáveis, polímeros solúveis em água incluem, mas não são limitados a, polietileno glicol (PEG), polietileno glicol propionaldeído, copolímeros de glicol de etileno/propileno glicol, monometóxi-polietileno glicol, carboximetilcelulose, dextrano, álcool polivinílico (PVA), polivinil pirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de anidrido maleico/etileno, poli (β -aminoácidos) (homopolímeros ou copolímeros aleatórios), poli (n-vinil pirrolidona) polietileno glicol, homopolímeros polipropileno glicol (PPG) e outros óxidos de polialquileno, copolímeros de óxido de polipropileno de óxido de etileno, polióis polioxietilados (POG) (por exemplo, glicerol) e outros polióis polioxietilados, sorbitol polioxietilado ou glicose polioxietilado ou outros polímeros de carboidratos, Cyp2e1 ou dextrano e misturas dos mesmos.

[00147] Porções PEG da invenção podem ser polímeros de cadeia linear ou ramificada. Em uma modalidade, a presente invenção contempla um polipeptídeo derivado quimicamente, que inclui porções de PEG mono-ou poli-(por exemplo, 2-4). Peguilação pode ser efetuada por qualquer das reações de peguilação conhecidas na técnica. Métodos para a preparação de um produto de proteína peguilada são geralmente conhecidos na técnica. As condições de reação ideais serão determinadas caso a caso, dependendo dos parâmetros conhecidos e no resultado desejado.

[00148] Há um número de métodos de ligação de PEG disponíveis para os versados na técnica, por exemplo, EP 0 401 384; Martins et al., *Exp. Hematol*, (1992) 20:1028-1035; Francis, *Focus on Growth Factors*, 3:4-10 (1992); EP 0 154 316; EP 0 401 384; WO 92/16221; WO 95/34326; e as outras publicações citadas neste documento que se relacionam à peguilação.

[00149] Quando um g3p, domínio N1N2, domínio N2 ou outro fragmento de ligação ao amiloide (bem como os mutantes e variantes destes compostos, e os polipeptídeos e proteínas de fusão que compreendem qualquer um dos precedentes) é tratado com PEG, o PEG pode estar ligado por qualquer quimicamente derivando o G3P, domínio N1N2, domínio N2 ou outro fragmento de ligação ao amiloide. Em outras modalidades, um resíduo de aminoácido adequado para modificação por uma molécula de PEG pode ser recombinante introduzido a g3p, N1N2 domínio, domínio de N2 ou outro fragmento de ligação de amiloide.

[00150] Peguilação pode ser realizada através de uma reação de acilação ou uma reação de alquilação com uma molécula de polietilenoglicol reativa. Assim, os produtos de proteína da presente invenção incluem proteínas peguilados, em que os grupos de PEG são fixados através de grupos acilo ou alquila. Tais produtos podem ser monopeguilado ou polipeguilado (por exemplo, aqueles que contêm grupos de PEG de 6-2 ou 2-5). Um exemplo de um éster de PEG ativado apropriado é PEG esterificado a N-Hidroxissuccinimida (NHS).

[00151] Peguilação por alquilação geralmente envolve reagir um derivado de aldeído terminal do PEG com um polipeptídeo na presença de um agente redutor. Para a reação de alquilação redutora, o (s) polímero(s) selecionado (s) deve ter um único aldeído reativo. Um exemplar aldeído reativo de PEG é propionaldeído glicol de polietileno, que é água estável, ou mono C1-C10 alcóxi ou arilóxi seus derivados, por exemplo, vide Patente US no. 5.252.714.

[00152] Em algumas modalidades, g3p, domínio N1N2, domínio de N2 ou outro fragmento de ligação de amiloide manifesta-se como parte de um fago e a g3p, domínio N1N2, domínio N2 ou outro fragmento de ligação de amiloide é preparado isolando-o do fago partículas. Em geral, no entanto, técnicas de recombinação são usadas para preparar

o g3p, fragmento de ligação de amiloide de g3p (incluindo mutantes e suas variantes). Em geral, a proteína resultante é isolada antes combinando com um veículo.

[00153] Em algumas modalidades, o veículo de exposição é um fago. Nestas modalidades, um gene que codifica uma proteína de g3p, domínio N1N2, domínio de N2 e outro fragmento de ligação de amiloide (incluindo mutantes e variantes de todo o exposto) é incorporado em um genoma bacteriófago e expresso como parte do fago. Por exemplo, em uma modalidade, uma proteína mutante g3p com maior afinidade de ligação de amiloide que o g3p do fago M13 é usada para substituir o tipo selvagem g3p do fago M13. O fago resultante, portanto, também tem ligação melhorada em relação ao tipo selvagem M13. No entanto, qualquer um dos fragmentos de ligação do g3p ou amiloide descrito pode ser incorporado em um fago. Nestas modalidades, o gene de tipo selvagem 3 pode ser substituído inteiramente por um g3p da invenção. Alternativamente, como discutido por fagos com o aumento do número de cópias de g3p, a molécula recombinante pode ser fundida com um gene que codifica uma proteína de revestimento do fago (incluindo tipo selvagem g3p) e exibida no fago de uma maneira análoga ao antígeno e cadeias de anticorpos em bibliotecas de exibição em fagos. Qualquer bacteriófago filamentosos pode ser modificado para expressar um g3p da invenção, incluindo, mas não limitado a M13, fd, f1, I22, Ike, ou If1. Em algumas modalidades, um fago auxiliar pode ser usado em conjunto com o fago modificado.

Técnicas de recombinação

[00154] Em geral, um DNA que codifica uma proteína g3p amiloide ou fragmentos de ligação (bem como os mutantes e variantes destes compostos e, polipeptídeos e proteínas de fusão que compreendem qualquer um dos precedentes) é preparado usando técnicas de DNA

recombinante convencionais, como a clonagem do gene de g3p, a síntese de DNA direta, ou por isolamento do DNA correspondente de uma biblioteca utilizando, por exemplo, a sequência de M13 como uma sonda. (*Vide, por exemplo*, Sambrook et al. 1989, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, , Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. e Ausubel et al. 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.).).

[00155] Para a produção recombinante, uma sequência de ácido nucleico que codifica uma g3p amiloide ou seu fragmento de ligação é inserido em um vetor de expressão adequado que contenha os elementos necessários para a transcrição e tradução da sequência de codificação inserida ou no caso de um vetor viral RNA, os elementos necessários para a replicação e tradução. O ácido nucleico de codificação é inserido no vetor no quadro de leitura correta.

[00156] Da mesma forma, a invenção fornece vetores compreendendo polinucleotídeos que codificam g3p ou um fragmento de ligação de amiloide respectivo (incluindo mutantes e suas variantes). Vetores compreendendo polinucleotídeos que codificam uma molécula de fusão g3p ou g3p também são fornecidos. Tais vetores incluem, mas não estão limitados a, vetores de DNA, vetores do fago, vetores virais, vetores retrovirais, etc.

[00157] Em algumas modalidades, é selecionado um vetor que é otimizado para expressão de polipeptídeos em CHO ou células derivadas de CHO. Exemplares de que tais vetores são descritos, por exemplo, in Running Deer et al., *Biotechnol. Prog.* (2004) 20:880-889. (2004) 20:880-889. (2004) 20:880-889.

[00158] Em algumas modalidades, um vetor é escolhido *in vivo* a expressão de g3p, fragmento de ligação amiloide de moléculas de fusão da mesma e / ou g3p em animais, incluindo seres humanos. Em algumas dessas modalidades, expressão do polipeptídeo está sob o

controle de um promotor que funciona de um modo específico do tecido.

[00159] Os vetores de expressão são transfectados ou cotransfectado para uma célula-alvo apropriada que irá expressar os polipeptídeos. Métodos não limitativos de transfecção exemplares são descritos, por exemplo, em Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001). Os ácidos nucleicos podem ser transientes ou estavelmente transfectados nas células hospedeiras desejadas, de acordo com métodos conhecidos na técnica. Uma variedade de sistemas de vetor hospedeiro pode ser utilizada para expressar as proteínas aqui descritas, incluindo a utilização de células procarióticas ou eucarióticas. Estes incluem, mas não se limitando a, micro-organismos tais como bactérias (*por exemplo, Escherichia coli*) transformadas com o ADN do bacteriófago recombinante ou vetores de expressão de plasmídeo de ADN contendo uma sequência de codificação apropriada; levedura ou fungos filamentosos transformados com levedura recombinante ou vetores contendo uma sequência de codificação apropriada expressão de fungos; sistemas de células de insetos infectados com vetores de expressão de vírus recombinante (*por exemplo, baculovirus*) contendo uma sequência de codificação apropriada; sistemas de células vegetais infectadas com vetores de expressão de vírus recombinante (*por exemplo, vírus do mosaico da couve-flor ou vírus do mosaico do tabaco*) ou transformada com vetores de plasmídeo de expressão recombinante (*por exemplo, plasmídeo Ti*) contendo uma sequência de codificação apropriada; ou sistemas de células de animais, incluindo células de mamíferos (*por exemplo, CHO, Cos, as células HeLa*). As proteínas também podem ser produzidas de forma recombinante em lentilha. Vide, por exemplo, Patente U.S. Nº. 8.022.270.

[00160] Vetores utilizados na transformação geralmente contêm um marcador selecionável, usado para identificar os transformantes. Em sistemas bacterianos, isso pode incluir um gene de resistência a antibióticos como ampicilina ou canamicina. Os marcadores selecionáveis para utilização em células de mamíferos cultivadas incluem genes que conferem resistência a fármacos, tais como neomicina, higromicina e metotrexato. O marcador selecionável pode ser um marcador selecionável amplificável. Um marcador selecionável amplificável é o gene DHFR. Outro marcador amplificável é o cDNA de DHFRr (Simonsen and Levinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, (1983) 80:2495). Marcadores selecionáveis são revistos por Thilly (*Mammalian Cell Technology*, Butterworth Publishers, Stoneham, MA) e a escolha dos marcadores de seleção está dentro do nível dos versados na técnica.

[00161] Os elementos de expressão dos sistemas de expressão variam em sua força e especificidades. Dependendo do sistema hospedeiro/vetor utilizado, qualquer um de um número de transcrição adequada e elementos de tradução, incluindo promotores constitutivos e induzível, pode ser utilizado do vetor de expressão. Por exemplo, quando a clonagem em sistemas bacterianos, promotores induzíveis como pL do bacteriófago λ , plac, ptrp, ptac (promotor híbrido ptrp-lac) e assim pode ser utilizado; Quando a clonagem em sistemas de células de inseto, promotores como o promotor de poliedro de baculovírus pode ser usado; Quando a clonagem em sistemas de célula de planta, promotores derivados do genoma de células vegetais (*por exemplo*, promotores de choque de calor; o promotor para a subunidade pequena de RUBISCO; o promotor para a / b da proteína de ligação de clorofila) ou de vírus de plantas (*por exemplo*., promotor 35S do RNA dos CaMV; o promotor de proteína do revestimento do TMV) pode ser utilizado; quando se clona em sistemas de células de

mamíferos, os promotores derivados do genoma de células de mamíferos (*por exemplo.*, promotor metalotioneína) ou de vírus de mamíferos (*por exemplo.*, o promotor tardio de adenovírus; do vírus vaccinia 7,5 K promotor) pode ser usado; ao gerar linhas de células que contêm cópias múltiplas do produto de expressão, SV40, BPV e vetores baseados em EBV podem ser utilizados com um marcador selecionável apropriado.

[00162] Em casos onde são utilizados vetores de expressão de plantas, a expressão de sequências que codificam para as formas lineares ou não cíclico do produto de expressão da invenção pode ser conduzida por qualquer um de um número de promotores. Por exemplo, promotores virais como os promotores 35S do RNA e 19S RNA dos CaMV (Brisson et al., *Nature* (1984) 310:511-514), ou o promotor de proteína do revestimento do TMV (Takamatsu et al. , *EMBO J.* 6:307 de (1987) 6:307-311) podem ser utilizados; em alternativa, os promotores de plantas tais como a pequena subunidade de RUBISCO (Coruzzi et al., *EMBOJ* (1984) 3:1671-1680; Broglie et al., *Science* (, 1984) 224:838-843) ou promotores de choque de calor, *por exemplo.*, soybean hsp17.5-E orhsp17.3-B (Gurley et al., (Gurley et al., *Mol. Cell. Biol.* (1986) 6:559-565) pode ser usado. Estes construtos podem ser introduzidos em células vegetais utilizando plasmídeos Ti, plasmídeos Ri, vetores de vírus de plantas, transformação direta de DNA, microinjecção, eletroporação, etc. Para revisões de tais técnicas , *vide, por exemplo.*, Weissbach & Weissbach 1988 , *Methods for PlantMolecular Biology*, Academic Press, NY, Section VIII, pp. 421-463; and Grierson & Corey 1988, *PlantMolecular Biology* , 2d Ed., Blackie, London, Ch.. 7-9.

[00163] Em um sistema de expressão de inseto que pode ser utilizado para produzir as proteínas da invenção *Autographa californica* vírus da poli-hidrose nuclear (AcNPV) é utilizado como um vetor para

expressar os genes estranhos. O vírus cresce em células de *Spodoptera frugiperda*. A sequência de código pode ser clonada em regiões não essenciais (por exemplo, o gene poliedro) do vírus e colocada sob controle de um promotor AcNPV (por exemplo, o promotor de poliedro). Inserção bem-sucedida de uma sequência de codificação resultará em inativação do gene do poliedro e produção de vírus recombinante não obstruída (*isto é*, vírus a que falta o revestimento proteico codificado pelo gene do poliedro). Estes vírus recombinantes são usados para infectar *Spodoptera frugiperda* células em que é expresso o gene inserido. (*vide, por exemplo*, Smith et al., *J. Virol.* (1983) 46:584; Patente U.S. 4.215.051). Outros exemplos deste sistema de expressão podem ser encontrados em Ausubel et al., eds. 1989, *Current Protocols in Molecular Biology* Vol. 2, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience.

[00164] Em células hospedeiras de mamífero, pode ser utilizado um número de sistemas de expressão baseado em vírus. Nos casos em que um adenovírus é usado como um vetor de expressão, uma sequência de codificação pode ser ligada a um complexo adenoviral de controle da transcrição / tradução, *por exemplo*, o promotor tardio e a sequência líder tripartida. Este gene de fusão em seguida pode ser inserido no genoma de adenovírus por *in vitro* ou *recombinação in vivo*. Inserção em uma região não essencial do genoma viral (*por exemplo*, região E1 ou E3) resultará em um vírus recombinante que é viável e capaz de expressar o peptídeo em hospedeiros infectados (*vide, por exemplo*, Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1984) 81:3655). Alternativamente, o promotor de vaccinia 7,5 K pode ser utilizado (*vide, por exemplo*, Mackett et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1982) 79:7415; Mackett et al., *J. Virol.* (1984) 49:857; Panicali et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1982) 79:4927). Outros sistemas de expressão virais incluem vírus adeno-associados e os lentivírus.

[00165] As células hospedeiras contendo s construtos de DNA são cultivadas em um meio de crescimento adequado. Como usado aqui, o termo "meio de cultura apropriado" significa um meio que contenha os nutrientes necessários para o crescimento das células. As proteínas recombinantes produzidas da invenção podem ser isoladas dos meios de cultura, utilizando técnicas convencionais na técnica.

Ensaio In Vitro

[00166] Em algumas modalidades, a desagregação de amiloide pode ser monitorada usando o ensaio de Thioflavin T fluorescência (ThT).

[00167] Em algumas modalidades, a desagregação é testada por monitorização detergente de solubilização na presença ou ausência de uma composição da invenção. Por exemplo, agregados α -sinucleína podem ser tratados com uma composição da invenção. Uma composição que desagrega o agregado α -sinucleína fará com que as α fibras sinucleína se solubilizem mais rápido em detergentes, tais como SDS, em comparação com fibras não tratadas. Esta conversão de fibras em formas solúveis pode ser monitorada pela incorporação de uma proporção da amiloide rotulado (*por exemplo*, com Cy5) α -monômeros sinucleína durante a agregação.

[00168] Em algumas modalidades, impedindo a formação de oligômeros de amiloide tóxicos é testada por um ensaio de citotoxicidade de cultura de células neuronais. Neste ensaio, as células de neuroblastoma diferenciadas N2a ou equivalentes são coincubadas com oligômeros A β 42. Os oligômeros ligam as membranas e causam perturbação da membrana e o vazamento de enzimas citosólicas no meio. Incubação prolongada com altas concentrações de oligômeros matará as células. Quando oligômeros são pré-tratados com fago ou g3p antes da incubação com células, os oligômeros são pelo menos tóxicos e às vezes não tóxicos. Este efeito neutralizante pode ser

quantificado medindo-se o lançamento do de adenilato cinase, uma enzima citosólica exemplar lançada pelas células neuronais após a perturbação da membrana.

[00169] Em algumas modalidades, uma composição da invenção inibe a conversão de proteína príon solúvel em conformador de K resistente à protease no ensaio de amplificação cíclica de enovelamento de proteína (PMCA). Wang et al., Science, (2010) 327:1132-35. Neste ensaio, PrP recombinante é misturado com o lipídio POPG e RNA na presença ou ausência de uma composição da invenção. O material é então submetido a múltiplos (por exemplo, 48 ciclos) de uma segunda sonicação 30 seguido de 29,5 minutos de incubação. Uma fração da mistura de reação é usada para propagar um outro tubo de substrato e o ciclo repete. Cada rodada é testada para a presença de proteinase K resistente material, que é indicativo da forma infecciosa do PrP. Redução em material resistente à proteinase K na presença de uma composição da invenção indica que a composição inibe a formação do confórmero resistente a PK.

[00170] Como mencionado acima, as formas de amiloide de certas proteínas príons, tais como a proteína NM de levedura príon, também pode ser detectada no ensaio de armadilha de filtro. Nesse sentido, dependendo da proteína prévia, em algumas modalidades a capacidade de uma composição da invenção para desagregar os agregados da proteína do príon podem ser testados no ensaio de armadilha de filtro.

Ensaio funcionais in vivo

[00171] Além das atividades, tais como o aumento da afinidade de ligação para amiloide ou diminuição do T_M , que pode ser demonstrado em ensaios *in vitro*, composições da invenção também podem reduzir a amiloide em um dos vários ensaios *in vivo*. Um método para determinar a redução amiloide *in vivo* usa a tomografia por emissão de

pósitrons (PET) com a imagem florbetapir do agente (F18-AV-45, Eli Lilly) antes e após o tratamento para comparar o número e/ou distribuição de β - amiloide. Claro que, como biomarcadores adicionais são identificados, podem também ser usados para medir a redução de amiloide.

[00172] Outro método para determinar se uma composição reduz amiloide *in vivo* usa o modelo do rato HaPP. Rockenstein, J Neurosci Res. (2001) 66(4):573-82. Estes ratos desenvolvem altos níveis de β - amiloide em idade precoce (3 a 4 meses). A capacidade de uma composição para reduzir a amiloide pode ser determinada injetando em ratos uma composição da invenção, em seguida, comparando os níveis de amiloide nesses ratos em comparação com os controles não injetados. Também é possível injetar uma composição em apenas um hemisfério de um rato hAPP, permitindo a comparação dos níveis de amiloide entre hemisférios injetados e não injetados no mesmo rato.

[00173] Em outro exemplo, composições da invenção são testados no modelo do rato geneticamente modificado para a doença de Alzheimer (TgAD) descrito em US2011/0142803, Hsiao et al., Science (1996) 274:99-102, ou Duyckaerts et al., Acta Neuropathol (2008) 115:5-38. Brevemente, ratos de tipo selvagem, bem como transgênicos, são desafiados. Para avaliar o potencial de uma composição da invenção para atuar como agente de desagregação, uma composição é injetada intracraniana em ratos transgênicos (Taconic, APPSWE (2576), 10 meses de idade). Por exemplo, para composições compreendendo fago, 2,5 l μ a solução do fago filamentoso (10^{14} fago/ml) foram injetados mais de 10 minutos (Bregma-2,8 mm, laterais de 2,5 mm, ventral 2,5 mm) de um hemisfério, enquanto para o lado contralateral, tampão fosfato salino (PBS) é aplicado como um controle. Ratos tratados então são sacrificados em pontos diferentes de tempo e cérebro pós-fixado

durante a noite em paraformaldeído 4% e corte usando um micrótomo. Coloração de Tioflavina-S (ThS) é realizada para avaliar a carga amiloide. As seções são coradas com hematoxilina de Mayer para saciar autofluorescência nuclear e depois da solução de lavagem ThS (1%) é aplicada por 3 minutos. A diferenciação é feita usando ácido acético a 1% durante 20 min e depois as lavagens, as lâminas são secas e montadas com meio de montagem anti-desbotamento. Carga amiloide é calculada usando o programa LEICA Qwin. Alternativamente, carga amiloide pode ser avaliada com um anticorpo anti-amiloide.

[00174] A biodistribuição de radioativo (*por exemplo*, I^{125}) ou composições fluorescentes rotuladas ou sem rótulo, incluindo fago filamentosos, também podem ser medidas para mostrar que uma composição liga amiloide *in vivo*. Por exemplo, quando a composição é composta por fago, o fago filamentoso pode ser radioativo ou fluorescente rotulado. Ratos BALB/c são divididos em grupos. Cada rato, em seguida, recebe por 100 μ l do fago ($1,25 \times 10^{12}$ fago) mais de uma hora. O primeiro grupo de ratos é sacrificado uma hora após a administração da perfusão intracardial usando paraformaldeído 4%. O segundo grupo é sacrificado 3 horas pós-tratamento e o último grupo, depois de 24 horas. Após a perfusão, o cérebro, bem como os órgãos periféricos são removidos e o rótulo é medido. Alternativamente, as composições sem rótulo ou fago pode ser avaliado para ligação usando métodos semelhantes, mas co-colorindo seções do cérebro com uma mancha que reconhece amiloide e uma mancha que reconhece a composição ou fago.

[00175] Administração intranasal do fago filamentosos também é usado para avaliar totalmente composto por fago, tais como fago compreendendo um g3p mutante ou fragmento de ligação de amiloide do g3p ou fago com aumento do número de g3p em relação ao tipo

selvagem do fago, tal como fornecido pela invenção. Por exemplo, os fagos são administrados por via intranasal para SWE/APP2576 ratos transgênicos (Taconic, 10 meses de idade), um modelo do rato da doença de Alzheimer. Vinte microlitros de solução do fago ($5 \times 10^{12}/\text{ml}$) são aplicados a cada duas semanas, para 4 a 12 meses e funções cognitivas são avaliadas. Após o período de tratamento, um teste de novo reconhecimento de objetos é realizado para estudar a influência do tratamento de fagos na melhoria da memória. No primeiro dia, os ratos estão expostos a dois novos objetos por 20 minutos. No dia seguinte, um objeto é substituído e a curiosidade dos ratos para explorar o novo item é testada. Um índice de reconhecimento é calculado para cada rato, dividindo o tempo que passou perto do novo objeto pelo tempo total gasto perto de ambos os objetos. Assim, valores acima de 0,5 são indicativos para reconhecer o item antigo e passar mais tempo em torno do novo objeto para o inquérito.

[00176] Outros modelos transgênicos de doença de envelhecimento incorreto da proteína podem também ser utilizados para demonstrar que uma composição da invenção reduz amiloide. Os exemplos não limitantes incluem a "linha D" α ratos sinucleína (a model of Parkinson's Disease, Masliah et al., Science (2000) 287:1265-1269); Ratos Tg2576 (um modelo da doença de Alzheimer, Hsiao et al., Science (1996) 274:99-102 and Duyckaerts et al., Acta Neuropathol (2008) 115:5-38-9); vários ratos Jax® para investigação da doença de Parkinson (laboratórios de Jackson, Bar Harbor, ME); e rato e modelos de rato disponíveis da JSW Lifescience, incluindo aqueles para a doença de Parkinson, a doença de Alzheimer, a doença de Huntington.

[00177] Fago em que g3p foi processado inativo deverá estar inativo nestes ensaios, considerando que o fago de tipo selvagem colocizam a amiloide, reduz a carga amiloide, previne a formação de

amiloide, e / ou remove oligômeros tóxicos e resulta em melhora na função cognitiva. Fago compreendendo um g3p ou um fragmento de ligação de amiloide, conforme fornecido pela invenção, pode assim ser testado para *atividade* in vivo em relação a esses controles positivos e negativos.

Composições farmacêuticas

[00178] Em outro aspecto, a invenção fornece composições farmacêuticamente aceitáveis, que compreendem qualquer um dos agentes acima descritos da invenção (isto é, (a) g3p, ligação de fragmentos de amiloide de g3p, ou mutantes ou seus variantes; (b) compostos, polipeptídeos e proteínas da fusão compreendendo g3p, fragmentos de ligação de amiloide do g3p ou mutantes ou variantes; (c) bacteriófago filamentosos tendo um aumento do número de cópias de g3p, em comparação com o tipo selvagem do fago; (d) veículos de rolamento de exibição de ligação amiloide g3p, fragmentos de ligação de amiloides de g3p, mutantes ou suas variantes ou compostos, polipeptídeos e proteínas de fusão compreendendo g3p, fragmentos de ligação amiloides de g3p, ou mutantes ou variantes do mesmo; ou (e) variantes de rolamento de fagos filamentosos modificados de g3p, fragmentos de ligação amiloides de g3p (não como parte de uma proteína g3p apresentada), mutantes ou variantes de tais fragmentos de ligação ou de proteínas de fusão ou outros polipeptídeos heterólogos que compreendem g3p, fragmentos de ligação amiloides de g3p ou os mutantes ou variantes dos mesmos).

[00179] Uma "composição farmacêutica" refere-se a uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição como aqui descrita, com um veículo e / ou excipiente fisiologicamente adequado. Uma composição farmacêutica não causa irritação significativa para um organismo. As frases "veículo fisiologicamente aceitável" e "veículo farmacêuticamente aceitável", que podem ser usadas de forma

intercambiável referem-se a uma operadora ou um diluente que não causa irritação significativa para um organismo e não revoga a atividade biológica e propriedades da composição administrada.

[00180] O termo "excipiente" refere-se a uma substância inerte adicionada a uma composição farmacêutica para facilitar ainda mais a administração de um ingrediente ativo. Exemplos, sem limitação, incluem, por exemplo, solução salina, carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, diversos açúcares e tipos de amido, derivados de celulose, gelatina, óleos vegetais, polietileno glicóis e surfactantes, incluindo, por exemplo, polissorbato 20.

[00181] As composições farmacêuticas para uso em conformidade com a presente invenção, portanto, podem ser formuladas de forma convencional, usando um ou mais veículos fisiologicamente aceitáveis, compreendendo excipientes e auxiliares que facilitam o processamento dos compostos ativos em preparações que podem ser usadas farmaceuticamente. Formulação adequada é dependente sobre a via de administração escolhida e sobre a natureza da composição entregue (por exemplo, a proteína versus fago).

[00182] As vias adequadas de administração para as composições farmacêuticas da invenção podem, por exemplo, incluir transmucosa, entrega especialmente transnasal; entrega parentérica, incluindo intramuscular, subcutânea, intramedular, intratecal, intraventricular, por via intravenosa, intraperitoneal, intranasal, ou injeções intraoculares; bucal; ou entrega retal.

[00183] Em algumas modalidades, uma composição farmacêutica é administrada de forma local, ao invés de sistêmica, por exemplo, através da injeção da composição farmacêutica diretamente no cérebro de um paciente. Em algumas modalidades, a técnica de injeção é qualquer técnica que evite a barreira sangue-cérebro, por exemplo, por intramedular direta, intratecal ou injeção intraventricular.

[00184] Para a injeção, os ingredientes ativos da invenção podem ser formulados em soluções aquosas, preferencialmente em tampões fisiologicamente compatíveis tais como solução de Hank, solução de Ringer ou tampão salina fisiológica. Para administração transmucosa, penetrantes apropriados para a barreira a ser permeada são usados na formulação. Esses penetrantes são geralmente conhecidos na técnica.

[00185] Em algumas modalidades, uma composição farmacêutica da invenção é administrada através de administração intranasal. Entrega intranasal tem sido relatada para permitir a entrada direta de vírus e macromoléculas no fluido cerebrospinal (CSF) ou CNS. Mathison et al, 1998; Chou et al., 1997; Draghia et al., 1995.

[00186] Para a administração por via nasal, as composições são convenientemente distribuídas sob a forma de uma apresentação de spray em aerossol de pacotes pressurizados ou de um nebulizador, com o uso de um propulsor adequado, por exemplo, diclorodifluorometano, tricloromonofluorometano, diclorotetrafluoroetano ou dióxido de carbono. No caso de aerossol pressurizado, a unidade de dosagem pode ser determinada, fornecendo uma válvula para distribuir uma quantidade medida. Cápsulas e cartuchos, por exemplo, de gelatina para uso em um inalador ou insuflador podem ser formuladas contendo uma mistura de pó do composto e uma base de pó adequada, tal como a lactose ou o amido.

[00187] As várias proteínas aqui descritas como componentes de composições farmacêuticas podem também ser entregues para o cérebro usando os neurônios receptores olfativos como um ponto de entrega. Por exemplo, um vetor de adenovírus, compreendendo um gene que codifica a qualquer uma dessas proteínas pode ser entregue via neurônios receptores olfativos. Draghia et al., 1995.

[00188] As composições podem ser formuladas para a administração parenteral por injeção, por exemplo, injeção em bolo ou infusão contínua. As composições farmacêuticas para a administração parenteral incluem soluções dos compostos ativos na forma solúvel em água. Além disso, as suspensões dos ingredientes ativos podem ser preparadas como suspensões oleosas para injeção ou à base de água. Os solventes ou veículos lipófilos adequados incluem óleos graxos tais como óleo de sésamo, ou ésteres de ácidos graxos sintéticos, tais como oleato de etila, triglicerídeos ou lipossomas. As suspensões de injeção aquosas podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão, tais como carboximetilcelulose de sódio, sorbitol ou dextrano. Opcionalmente, a suspensão também pode conter estabilizadores apropriados ou agentes (por exemplo, surfactantes como polissorbato (Tween 20)), que aumentam a solubilidade dos ingredientes ativos para permitir a preparação de soluções altamente concentradas. Um agente de proteína baseado, tais como, por exemplo, albumina pode ser utilizada para evitar a adsorção de M13 à superfície de entrega (isto é, bolsa de soro, cateter, agulha, etc.).

[00189] Para a administração oral, as composições podem ser formuladas facilmente, combinando os compostos ativos com os veículos farmacêuticamente aceitáveis conhecidos na técnica.

[00190] As formulações para injeção podem ser apresentadas sob forma de dosagem de unidade, por exemplo, em ampolas ou em recipientes de doses múltiplas, com um conservante adicionado. As composições podem ser suspensões, como suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos e podem conter agentes formulatórios, como agentes de suspensão, estabilização e/ou de dispersão. Formas de dosagem única podem ser em um líquido ou um sólido. Formas de dosagem única podem ser administradas

diretamente a um paciente sem modificação ou podem ser diluídas ou reconstituídas antes da administração. Em determinadas modalidades, uma forma de dosagem única pode ser administrada na forma de bolo, por exemplo, a injeção única, a dose oral única, incluindo uma dose oral, que compreende vários comprimidos, cápsula, comprimidos, etc. Em modalidades alternativas, uma forma de dosagem única pode ser administrada durante um período de tempo, tal como por infusão ou através de uma bomba implantada, tal como uma bomba do ICV. Na última modalidade, a forma de dosagem única pode ser uma bolsa de infusão ou do reservatório da bomba pré-cheia com o número indicado de bacteriófago filamentoso. Alternativamente, a bolsa de infusão ou do reservatório da bomba pode ser preparada imediatamente antes da administração a um paciente através da mistura de uma dose única do bacteriófago filamentoso com a bolsa de infusão ou solução do reservatório da bomba.

[00191] Outro aspecto da invenção inclui métodos para a preparação de uma composição farmacêutica da invenção. Técnicas para formulação de medicamentos podem ser encontradas, por exemplo, em "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., última edição de Easton, PA., que está incorporada neste documento por referência, na sua totalidade.

[00192] Composições farmacêuticas adequadas para uso no contexto da presente invenção incluem composições em que os ingredientes ativos estão contidos em uma quantidade eficaz para atingir o objetivo pretendido.

[00193] A determinação de uma quantidade terapeuticamente ou diagnosticamente eficaz está bem dentro da capacidade dos versados na técnica, especialmente à luz da descrição pormenorizada aqui fornecida.

[00194] A quantidade de dosagem e intervalo podem ser ajustados

individualmente para proporcionar níveis cerebrais do veículo de apresentação de fagos, que são suficientes para tratar ou diagnosticar uma doença específica do cérebro, distúrbio ou condição (concentração mínima eficaz, MEC). A MEC variará para cada composto, mas pode ser estimada a partir de dados in vitro. As dosagens necessárias para alcançar a MEC dependerão de características individuais e da via de administração.

[00195] Os intervalos de dosagem também podem ser determinados usando o valor da MEC. Os preparativos devem ser administrados usando um regime, que mantém os níveis do cérebro acima da MEC para 10 a 90% das vezes, preferível entre 30 a 90% e mais de preferência 50 a 90%.

[00196] Dependendo da gravidade e capacidade de resposta do estado a ser tratado, a dosagem pode ser de um único ou uma pluralidade de administrações, com curso de tratamento que dura desde vários dias a várias semanas ou até a cura ser efetuada ou diminuição do estado da doença ser conseguido.

[00197] A quantidade de uma composição a ser administrada irá, evidentemente, ser dependente do sujeito a ser tratado ou diagnosticado, a gravidade da aflição, do julgamento do médico que prescreve, etc.

[00198] Composições da presente invenção podem, se desejado, ser apresentadas em um pacote ou dispositivo dispensador, tal como um FDA que aprovou o kit, que pode conter uma ou mais formas de dosagem de unidade que contém o ingrediente ativo. A embalagem pode, por exemplo, compreender uma folha de metal ou de plástico, tal como um pacote alveolar. A embalagem ou dispositivo dispensador pode ser acompanhado por instruções para administração. O pacote ou dispensador também pode ser acomodado por aviso associado com o recipiente em um formulário elaborado por uma agência

governamental que regulamenta a fabricação, uso ou venda de produtos farmacêuticos, que o aviso é o reflexo de aprovação pelo órgão da forma das composições ou humano ou administração veterinária. Tal notificação, por exemplo, pode ser de rotulagem aprovada pelo US Food and Drug Administration para medicamentos prescritos ou de uma inserção do produto aprovado. As composições que compreendem uma preparação da invenção formulada em um veículo farmacêutico compatível também podem ser preparadas, colocadas em um recipiente apropriado e rotuladas para tratamento de uma condição indicada.

[00199] Deve ser entendido que tanto a descrição anterior e a seguinte descrição detalhada são apenas exemplares e explicativas e não são restritivas da invenção, conforme reivindicado.

Usos terapêuticos

[00200] Como observado, o bacteriófago filamentoso M13 e fagos filamentosos relacionados, têm mostrado utilidade em modelos animais de doença por dobramento errado de proteína. Vide Publicação de Patente dos Estados Unidos US 2011/0142803, incorporada neste documento em sua totalidade para referência. Em particular, foi descoberto que bacteriófagos filamentosos têm a capacidade de desagregar a depuração de amiloide que já se formou no cérebro. A remoção de amiloide é esperada para reduzir, retardar a progressão ou mesmo reverter os sintomas associados a uma variedade de doenças caracterizadas por amiloide. Vide, por exemplo, WO2006083795 e WO2010060073, incorporadas neste documento em sua totalidade para referência.

[00201] Ainda mais, M13 tem sido mostrado para desagregar a pelo menos quatro diferentes fibras de amiloide: fibras de amiloide β 1-42 (fA β 42), α -fibras sinucleínas (f α syn), fibras de prion NM de levedura (fNM) e fibras de tau (ftau).

[00202] Da mesma forma, um outro aspecto da invenção refere-se ao uso de qualquer uma das composições da invenção, tais como aqueles compreendendo g3p, domínio N1N2 , domínio N2 ou outros fragmentos de ligações amiloide (incluindo mutantes ou variantes de tudo o que precede) ou proteínas da fusão g3p, veículos de exposição ou fago composto por qualquer um dos acima, no tratamento de doenças de dobramento errado de proteínas, incluindo, mas não limitado a, as doenças que envolvem qualquer fA β 42, f α syn, fNM ou ftau.

[00203] No contexto de tratamentos, os termos "paciente", "assunto" e "destinatário" são usados trocavelmente e incluem os seres humanos, bem como outros mamíferos. Em algumas modalidades, um paciente é um ser humano que é positivo para um biomarcador associado com uma doença de dobramento errado de proteína. Em uma modalidade, as exposições dos pacientes deposita β amiloide como detectado por imagiologia de PET com florbetapir.

[00204] O termo "tratamento" destina-se a significar a redução, diminuindo ou revertendo a progressão de uma doença em um paciente que exibe um ou mais sintomas clínicos de doença. "Tratar" também pretende significar reduzir, abrandar ou reverter os sintomas de uma doença em um paciente que exibe um ou mais sintomas clínicos de mais de uma doença. Em uma modalidade, as exposições dos pacientes que depositam β amiloide como detectado por imagiologia de PET com florbetapir e o número de β depósitos de amiloide são reduzidos pelo tratamento. Em uma modalidade, o paciente apresenta β depósitos amiloides como detectados pelas composições g3p da presente invenção e o número de β depósitos amiloides são reduzidos ou mantidos pelo tratamento. Em outra modalidade, o paciente apresenta qualquer tipo de depósitos de amiloide, como detectado por imagiologia de PET e a função cognitiva

do paciente é melhorada pelo tratamento. Melhora da função cognitiva pode ser analisada por métodos e testes de McKhann et al., *Alzheimer's & Dementia* (2011) May;7(3):263-9.

[00205] "Profilaxia" é distinta do tratamento e refere-se à administração de uma composição para um indivíduo antes do início dos sintomas clínicos. Profilaxia usando qualquer um do g3p e/ou composições de ToIA da presente invenção é envolvida. Profilaxia pode ser implicada em indivíduos que são conhecidos por serem um risco aumentado para a doença ou quem são certas de desenvolver uma doença, unicamente com base em um ou mais marcadores genéticos. Muitos marcadores genéticos foram identificados para a proteína de várias doenças de dobramento errado. Por exemplos, os indivíduos com um ou mais da mutação sueca, a mutação Indiana ou a mutação em Londres, em humano a proteína precursora de amiloide (Hap) estão em risco aumentado para o desenvolvimento de início precoce da doença de Alzheimer e por isso são candidatos para a profilaxia. Da mesma forma, os indivíduos com a repetição de trinucleotídeos CAG no gene da huntingtina, particularmente aqueles com 36 ou mais repetições, acabará por desenvolver a doença de Huntington e por isso são candidatos à profilaxia.

[00206] Em algumas modalidades, uma proteína ou fragmento é usado diretamente como um terapêutico. Nestas modalidades, um g3p, domínio N1N2, domínio N2 ou outros fragmentos de ligação de amiloide (incluindo mutantes ou variantes de qualquer um dos anteriores) é diretamente incorporada em uma composição farmacêutica ou formulação. Em outras modalidades, um g3p, domínio N1N2, domínio de N2 ou outro fragmento de ligação de amiloide (incluindo mutantes ou variantes de qualquer um dos anteriores) é parte de uma fusão da proteína ou exibição veículo, tais como um fago e estas modalidades são o veículo de proteína ou exibição de fusão

incorporado em uma composição farmacêutica ou formulação da invenção. Em outras modalidades, a composição compreende um fago compreendendo g3p ou ligação de fragmento amiloide do mesmo que é mais eficaz do que g3p do tipo selvagem do fago M13 na redução ou manutenção dos níveis de amiloide. Em algumas modalidades, o fago é mais eficaz na redução ou manutenção dos níveis de amiloide do M13, que expressa mais de 5 cópias de um g3p.

[00207] O termo "proteína de dobramento errado" refere-se às doenças caracterizadas pela formação de proteína amiloide por uma agregação da proteína (amiloide formando peptídeos), tais como, mas não se limitando a, β -amiloide, soro amiloide A, cistatina C, cadeia leve de IgG capa ou uma proteína príon. Doenças conhecidas por serem associadas com dobramento errado e / ou a proteína amiloide agregada incluem a doença de Alzheimer, que inclui a doença de início precoce de Alzheimer, de início tardio da doença de Alzheimer, e doença de Alzheimer pré-sintomático, da doença de Parkinson, a SAA amiloidose, cistatina C, síndrome Islândia hereditária, senilidade, mieloma múltiplo, doenças provocadas por príons, incluindo, mas não se limitando a kuru, da doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), doença de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), a insônia familiar fatal (FFI), scrapie e encefalite espongiforme bovina (BSE); A esclerose lateral amiotrófica (ALS), ataxia espinocerebelar (SCA1), (SCA3), (SCA6), (SCA7), doença de Huntington, atrofia dentatorubral Pallidolusian, atrofia muscular espinhal e bulbar, hereditária angiopatia amiloide cerebral, amiloidose familiar, demência frontotemporal lobo, demência britânica e dinamarquesa e encefalopatia familiar. As composições de g3p da invenção podem ser usadas para tratar doenças "proteínas de dobramento errado".

[00208] Muitos destes dobramentos errados e/ou agregados de doenças de proteína amiloide ocorrem no sistema nervoso central

(CNS). Alguns exemplos de doenças que ocorrem no CNS são a doença de Parkinson; A doença de Alzheimer; demência frontotemporal (FTD), incluindo aqueles pacientes com as seguintes síndromes clínicas: variante comportamental FTD (bvFTD), afasia não fluente progressiva (PNFA) e demência semântica (SD); Espinocerebelares de lobar frontotemporal (FTLDs); e a doença de Huntington. As composições de g3p da invenção podem ser usadas para tratar doenças caracterizadas pela proteína amiloide de dobramento errado e/ou agregada que ocorrem no sistema nervoso central (CNS).

[00209] O dobramento errado e/ou a agregação de proteínas também pode ocorrer fora do SNC. A amiloidose A (AA) para a qual a proteína precursora é uma alipoproteína de fase aguda, SAA) e o mieloma múltiplo (cadeia leve e/ou pesada da imunoglobulina de proteínas precursoras) são duas doenças de proteína agregada e/ou com dobramento errado amplamente conhecidas que ocorrem fora do SNC. Outros exemplos incluem doença envolvendo amiloide formado por β_2 -microglobulina, transtirretina (Polineuropatia Amiloidótica Familiar [FAP], Cardiomiopatia Amiloidótica Familiar [FAC] e Amiloidose Sistêmica Senil [SSA]), (apo)AA sérica, apolipoproteínas AI, AII e AIV, gelsolina (forma finlandesa da Polineuropatia Amiloidótica Familiar), lisozima, fibrinogênio, cistatina C (Angiopatia Amiloide Cerebral, Hemorragia Cerebral Hereditária com Amiloidose, tipo islandês), (pro)calcitonina, polipeptídeo amiloide de ilhotas (amiloidose IAPP), fator natriurético atrial, prolactina, insulina, lactaderina, querato-epitelina, lactoferrina, proteína associada ao ameloblasto odontogênico, e semenogelina I. As composições de g3p da invenção podem ser usadas para tratar doenças que envolvem o dobramento errado e/ou agregação de proteínas que ocorrem fora do SNC.

[00210] Doenças neurodegenerativas também podem envolver lesões de tau. (Revisado em Lee et al. (2001) Annu. Rev. Neurosci. 24:1121-159). As proteínas tau são proteínas associadas a microtúbulos expressas em axônios de neurônios do sistema nervoso central e periférico. Tauopatias neurodegenerativas (às vezes referidas como tauopatias) são englobadas. Exemplos de tauopatias incluem a doença de Alzheimer, complexo esclerose lateral amiotrófica/demência de parkinsonismo, demência por grãos argirofílicos, degeneração corticobasal, doença de Creutzfeldt-Jakob, demência pugilística, emaranhados neurofibrilares difusos com calcificação, síndrome de Down, demência frontotemporal incluindo demência frontotemporal com parkinsonismo ligado ao cromossomo 17, doença de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, doença de Hallervorden-Spatz, distrofia miotônica, doença de Niemann-Pick tipo C, doença do neurônio motor não guamaniana com emaranhados neurofibrilares, doença de Pick, parkinsonismo pós-encefalite, angiopatia amiloide cerebral da proteína do príon, gliose subcortical progressiva, paralisia supranuclear progressiva, panencefalite esclerosante subaguda e demência apenas por emaranhado. Algumas dessas doenças também podem incluir depósitos de peptídeos amiloides β fibrilares. Por exemplo, a doença de Alzheimer apresenta tanto os depósitos amiloides β quanto as lesões de tau. De forma semelhante, as doenças mediadas por príon, tais como doença de Creutzfeldt-Jakob, angiopatia amiloide cerebral da proteína do príon e síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker também podem ter lesões de tau. Assim, uma indicação de que uma doença é uma "tauopatia" não deve ser interpretada como excluindo a doença de outras classificações ou agrupamentos de doenças neurodegenerativas, que são fornecidas meramente como uma conveniência. As composições de g3p da invenção podem ser usadas para tratar doenças neurodegenerativas, bem como as doenças

envolvendo lesões de tau.

[00211] Em uma modalidade, uma composição ou formulação farmacêutica é para uso em um método de redução de amiloide em um paciente exibindo sintomas relacionados à presença de amiloide ou que é positivo para um biomarcador associado a uma doença por dobramento errado de proteína, tal como florbetapir (AV-45, Eli Lilly), compreendendo a administração ao paciente de uma quantidade eficaz de uma composição ou formulação farmacêutica, conforme descrito neste documento. Em uma modalidade, a via de administração é selecionada a partir de injeção intratecal, injeção intraventricular direta, injeção intraparenquimal ou distribuição intranasal.

[00212] Em uma modalidade, uma composição ou formulação farmacêutica é para uso em um método de manutenção do nível de amiloide em um paciente exibindo sintomas relacionados à presença de amiloide ou que é positivo para um biomarcador associado a um doença por dobramento errado de proteína, tal como florbetavir (AV-45, Eli Lilly), compreendendo a administração ao paciente de uma quantidade eficaz de uma composição ou formulação farmacêutica, conforme descrito neste documento. Em uma modalidade, a via de administração é selecionada a partir de injeção intratecal, injeção intraventricular direta, injeção intraparenquimal ou distribuição intranasal.

[00213] Em uma modalidade, uma composição ou formulação farmacêutica é para uso em um método de desagregação de amiloide em um paciente compreendendo a administração a um paciente tendo amiloide de uma quantidade de uma composição ou formulação farmacêutica, conforme descrito neste documento. Em uma modalidade, a via de administração é selecionada a partir de injeção intratecal, injeção intraventricular direta, injeção intraparenquimal ou

distribuição intranasal.

[00214] Em uma modalidade, uma composição ou formulação farmacêutica é para uso em um método de provocar a desagregação de depósitos β -amiloides no cérebro, compreendendo a injeção direta no cérebro de um paciente em necessidade de uma quantidade eficaz da composição farmacêutica, conforme descrito neste documento, causando, assim, uma redução nos depósitos de β -amiloides no cérebro.

[00215] Em uma modalidade, uma composição ou formulação farmacêutica é para uso em um método de redução da formação de amiloide no cérebro. A redução da formação de amiloide no cérebro pode prevenir, tratar ou reduzir os sintomas ou a gravidade de uma doença neurodegenerativa ou por dobramento errado de proteína. Em uma modalidade, a via de administração é selecionada a partir de injeção intratecal, injeção intraventricular direta, injeção intraparenquimal ou distribuição intranasal.

[00216] Em uma modalidade, uma composição ou formulação farmacêutica da invenção é para uso em um método para promover a depuração de amiloide no cérebro. A promoção da depuração de amiloide pode prevenir, tratar ou reduzir os sintomas ou a gravidade de uma doença neurodegenerativa ou por dobramento errado de proteína. Em uma modalidade, a via de administração é selecionada a partir de injeção intratecal, injeção intraventricular direta, injeção intraparenquimal ou distribuição intranasal.

[00217] Em uma modalidade, uma composição ou formulação farmacêutica da invenção é para uso em um método para inibir a agregação de amiloide no cérebro. A inibição da agregação amiloide no cérebro pode prevenir, tratar ou reduzir os sintomas ou a gravidade de uma doença neurodegenerativa ou por dobramento errado de proteína. Em uma modalidade, a via de administração é selecionada a

partir de injeção intratecal, injeção intraventricular direta, injeção intraparenquimal ou distribuição intranasal.

[00218] Em uma modalidade, uma composição ou formulação farmacêutica da invenção é para uso em um método para a depuração de oligômeros amiloides tóxicos no cérebro. A depuração de oligômeros amiloides tóxicos no cérebro pode prevenir, tratar ou reduzir os sintomas ou a gravidade de uma doença neurodegenerativa ou por dobramento errado de proteína. Em uma modalidade, a via de administração é selecionada a partir de injeção intratecal, injeção intraventricular direta, injeção intraparenquimal ou distribuição intranasal.

[00219] Em uma modalidade, uma composição ou formulação farmacêutica da invenção é para uso em um método para prevenir a formação de oligômeros amiloides tóxicos no cérebro. A prevenção da formação de oligômeros tóxicos no cérebro pode prevenir, tratar ou reduzir os sintomas ou a gravidade de uma doença neurodegenerativa ou por dobramento errado de proteína. Em uma modalidade, a via de administração é selecionada a partir de injeção intratecal, injeção intraventricular direta, injeção intraparenquimal ou distribuição intranasal.

[00220] Em uma modalidade, uma composição ou formulação farmacêutica da invenção é para uso em um método para proteger os neurônios do dano amiloide. A proteção dos neurônios do dano amiloide pode prevenir, tratar ou reduzir os sintomas ou a gravidade de uma doença neurodegenerativa ou por dobramento errado de proteína. Em uma modalidade, a via de administração é selecionada a partir de injeção intratecal, injeção intraventricular direta, injeção intraparenquimal ou distribuição intranasal. Em uma modalidade, uma composição ou formulação farmacêutica da invenção para uso na proteção de neurônios do dano amiloide é dada profilaticamente.

[00221] Em algumas modalidades, o paciente é positivo para um biomarcador associado com uma doença por agregação e/ou por dobramento errado de proteína. Em uma modalidade, o biomarcador é florbetapir (AV45, Eli Lilly).

[00222] Em algumas modalidades, o paciente está exibindo sintomas de uma doença neurodegenerativa que é associada à presença de amiloide. Em várias modalidades, o amiloide é qualquer um de fA β 42, f α sin, fNM, ou ftau.

[00223] Em determinadas modalidades, a doença neurodegenerativa é a doença de Parkinson, doença de Alzheimer ou doença de Huntington. Em uma modalidade, a doença neurodegenerativa é a doença de Alzheimer. Em uma modalidade, a doença neurodegenerativa é a doença de Alzheimer e o paciente exibe β -amiloide, conforme detectado pelo agente formador de imagem florbetapir (AV-45, Eli Lilly).

[00224] Em algumas modalidades, o paciente está exibindo sintomas de uma doença mediada por príon.

[00225] Em determinadas modalidades, a doença mediada por príon é selecionada a partir de doença de Creutzfeldt-Jakob, kuru, insônia familiar fatal ou síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker.

[00226] Em algumas modalidades, o paciente está exibindo sintomas de uma taupatia neurodegenerativa diferente da doença de Alzheimer. Em determinadas modalidades, a doença a ser tratada é selecionada de demência por grãos argirofílicos, degeneração corticobasal, demência pugilística, emaranhados neurofibrilares difusos com calcificação, síndrome de Down, demência frontotemporal incluindo demência frontotemporal com parkinsonismo ligado ao cromossomo 17, doença de Hallervorden-Spatz, distrofia miotônica, doença de Niemann-Pick tipo C, doença do neurônio motor não guamaniana com emaranhados neurofibrilares, doença de Pick,

parkinsonismo pós-encefalite, gliose subcortical progressiva, paralisia supranuclear progressiva, panencefalite esclerosante subaguda e demência apenas por emaranhado.

Diagnósticos

[00227] Em outro aspecto da invenção, as composições de g3p e de ToIA descritas neste documento, incluindo proteínas de fusão de g3p, são usadas em aplicações de diagnósticos associadas as várias doenças descritas neste documento. Por exemplo, a ligação de uma composição da invenção, quando usada como um agente de formação de imagem tanto *in vivo* quanto *in vitro* pode ser parte de um diagnóstico de uma das doenças por dobramento errado de proteína descritas.

[00228] Agentes de diagnóstico, de outra forma, referidos neste documento como composições de diagnósticos, são englobados e podem compreender qualquer um dos agentes descritos acima da invenção (isto é, (a) g3p, fragmentos de ligação a amiloide de g3p, ou mutantes ou variantes dos mesmos; (b) compostos, polipeptídeos e proteínas da fusão compreendendo g3p, fragmentos de ligação a amiloide de g3p, ou mutantes ou variantes dos mesmos; (c) bacteriófago filamentoso portando um número aumentado de cópias de g3p em comparação com o fago do tipo selvagem; (d) veículos de exibição de ligação a amiloide portando g3p, fragmentos de ligação a amiloide de g3p, mutantes ou variantes dos mesmos, ou compostos, polipeptídeos e proteínas de fusão compreendendo g3p, fragmentos de ligação a amiloide de g3p, ou mutantes ou variantes dos mesmos; ou (e) fago filamentoso modificado portando variantes de g3p, fragmentos de ligação a amiloide de g3p (não como parte de uma proteína de g3p exibida), mutantes ou variantes de tais fragmentos de ligação, ou proteínas de fusão ou outros polipeptídeos heterólogos que compreendem g3p, fragmentos de ligação a amiloide de g3p, ou

mutantes ou variantes dos mesmos). O agente de diagnóstico pode compreender ainda uma marcação detectável, ou pode ser, por outro lado, detectado in vivo.

[00229] Em algumas modalidades, uma composição da invenção, tal como uma compreendendo uma g3p solúvel ou um fragmento de ligação a amiloide (incluindo mutantes e variantes dos mesmos) ou uma proteína de fusão de g3p, é usada como um agente formador de imagem amiloide. O agente formador de imagem pode detectar o amiloide e diagnosticar doenças associadas ao amiloide. Uma vez que as composições da invenção se ligam ao amiloide independentemente do tipo da fibra, elas são vantajosas no que podem formar a imagem de qualquer agregado de amiloide ($A\beta$, tau, α -sinucleína, etc.)— todos com um agente único de formação de imagem. Presentemente, não existem agentes/métodos de formação de imagem aceitáveis para agregados de tau ou de alfa sinucleína no SNC. E embora os agentes formadores de imagem para β -amiloide existirem, ainda há uma necessidade de agentes adicionais que podem proporcionar melhor correlação entre os resultados de função cognitiva e de imagem e/ou que melhor prevejam quais pacientes irão piorar versus quais permanecerão estáveis. Para uma revisão, vide Resnick & Sojkova, *Alzheimer's Res Ther.* (2011) 3(1):3.

[00230] As composições de diagnóstico da invenção podem ser usadas como agentes formadores de imagem em combinação com um agente formador de imagem são específicas para β -amiloide, tal como, por exemplo, F18-AV-45, Eli Lilly. Uma vez que não existem atualmente agentes formadores de imagem conhecidos para agregados não β -amiloides, o uso de uma composição de diagnóstico da invenção juntamente com um agente formador de imagem específico para β -amiloide resultará na detecção de agregados não β -amiloides com base na agregação diferencial. Assim, em uma

modalidade, uma composição de diagnóstico da invenção é usada como um agente formador de imagem em combinação com um agente formador de imagem β -amiloide para detectar agregados não β -amiloides.

[00231] Em outra modalidade, uma composição de diagnóstico da invenção é usada como um agente formador de imagem para detectar β -amiloide no SNC, incluindo o cérebro.

[00232] Uma composição de diagnóstico da invenção geralmente requer que o componente de ligação a amiloide seja anexado a uma ou mais marcações detectáveis quando usado como um agente formador de imagem. Várias marcações podem ser anexadas ao componente de ligação a amiloide da composição de diagnóstico, usando técnicas padrão para proteínas de marcação. Exemplos de marcações incluem marcações fluorescentes e radiomarcações. Há uma ampla variedade de radiomarcações que podem ser usadas, mas em geral a marcação é frequentemente selecionada a partir de radiomarcações incluindo, mas não limitada a, ^{18}F , ^{11}C e ^{123}I . Esses e outros radioisótopos podem ser anexados à proteína, usando uma química conhecida. Em uma modalidade, a marcação é detectada usando tomografia por emissão de pósitron (PET). No entanto, qualquer outra técnica adequada para a detecção de radioisótopos também pode ser usada para detectar o radiorastreador.

[00233] Composições de diagnóstico da invenção podem ser administradas usando as mesmas vias descritas para composições terapêuticas. Em uma modalidade, a administração intratecal é usada como a via para administrar a composição de diagnóstico. Em outra modalidade, a administração intravenosa é usada como a via para administrar a composição de diagnóstico.

Exemplos

[00234] Embora a eficácia terapêutica demonstrada do fago

filamentoso como agentes de ligação e antiagregação não seja depende de qualquer mecanismo específico de ação, a compreensão do mecanismo permite que o design do fago com maior eficácia terapêutica. Além disso, isto serve como uma base para a preparação de agentes antiagregação adicionais.

[00235] Conforme notado anteriormente, M13 tem sido mostrado se ligar e desagregar pelo menos quatro fibras amiloides diferentes: 1-42 fibras β -amiloides (fA β 42), fibras de α -sinucleína (f α sin), fibras de NM de prion de levedura (fNM) e fibras de tau (ftau). As quatro proteínas que compõem essas fibras amiloides têm uma sequência de aminoácidos primária não relacionada, mas todas as quatro são dobradas erradas na dobra amiloide canônica. Eichner & Radford, 2011. A capacidade de M13 em se ligar e mediar a desagregação de cada uma dessas indica que o M13 reconhece um motivo estrutural, tal como uma conformação em folha beta cruzada ou uma característica conformacional, tal como um entalhe hidrofóbico, ambos dos quais definem as características de todas as fibras amiloides.

[00236] Mas a desagregação amiloide não é uma propriedade geral de todos os fagos. Por exemplo, o fago icosaédrico estruturalmente distinto T17 não medeia a desagregação de fA β 42, mesmo quando T7 é incubado com fA β 42 por 3 dias a 37°C. O bacteriófago T7 não mostrou nenhuma atividade de dissociação nem nas concentrações nas quais M13 dissocia mais de 70% das fibras amiloides incubadas. Em contraste, o bacteriófago fd, que carrega um aminoácido negativamente carregado em sua g8p comparado ao M13 (e, portanto, exibe 2800 mais cargas/fago do que M13 dado o número de cópias de g8p), ligou e desagregou fA β 42 semelhante ao M13. Estes estudos iniciais, juntamente com a constatação de que a desagregação amiloide também poderia ser mediada pelo vírus do mosaico do tabaco (TMV), pili de *E. coli*, e os tubos de cauda de T4,

todos os que também têm uma forma cilíndrica helicoidal e unidades de repetição (vide US 2011/0182948), sugeriu que esta pode ser a forma do fago que é crítica para sua atividade de dissociação de fibra amiloide.

[00237] No entanto, os seguintes exemplos descrevem um mecanismo alternado (embora não mutuamente exclusivo) para a propriedade de ligação e antiagregação relatada do fago filamentoso. Com base nesses exemplos e no mecanismo de ação que eles apoiam, fagos modificados com melhor ligação ao amiloide são fornecidos juntamente com novos agentes de ligação a amiloide.

Exemplo 1: O fago M13 preferencialmente se liga às fibrilas β A

[00238] A ligação do M13 à fibrilas $A\beta$ versus aos monômeros $A\beta$ foi determinada por ressonância plasmônica de superfície (SPR).

[00239] O fago M13 preferencialmente se liga às fibrilas $A\beta$; ele não se liga aos monômeros $A\beta$. Estudos de ressonância plasmônica de superfície usando 10^{14} fago/mL fluídos através de um chip de biossensor com $fA\beta$ imobilizado são relatados na **Fig. 3. A Fig. 3** mostra que o K_D da ligação do M13 é cerca de 4 nM, que é comparável à ligação por um anticorpo monoclonal. Esta interação de alta afinidade indica que um processo de ligação específico está ocorrendo entre o fago e a fibra amiloide.

Exemplo 2: Ligação do M13 às fibrilas de Ab é dependente da dose

[00240] A ligação do M13 ao $fA\beta_{42}$ também é dependente da dose. Na **Fig. 4A**, a ligação de duas dose de fago com quantidades molares crescentes de $fA\beta_{42}$ foi comparada. Neste ensaio de ligação de M13-fibra amiloide, o M13-Alexa488 foi misturado com $A\beta$ ($fA\beta$) por 2-3 horas para permitir que os complexos se formem, em seguida o complexo sedimentou pela centrifugação a 7500 rpm por 10 minutos. A fluorescência no pélete foi proporcional ao M13 ligado ao amiloide.

Este ensaio fornece uma medida quantitativa de ligação do fago ao fA β e fornece um sistema para a avaliação da capacidade de outros agentes em competir com o fago pela ligação. **A Fig. 4B** mostra que o K_D para a competição de ligação ao M13 é semelhante àquele observado para a ligação usando ressonância plasmônica de superfície.

Exemplo 3: A ligação do M13 às fibrilas A β requer a conformação nativa

[00241] Quando o fago M13 é aquecido a 90°C por 10 minutos, sua capacidade de competir pela ligação é essencialmente anulada. **Fig. 5** mostra os resultados de competição de ligação usando M13 tratado pelo calor (caixas) versus de conformação nativa (círculos) no ensaio de ligação de competição de fibra amiloide.

Exemplo 4: A temperatura se correlaciona com as interações M13-amiloide

[00242] O M13 desagrega potencialmente as fibras amiloides. **A Fig. 6** mostra um ensaio de fluorescência com Tioflavina T (ThT) usando fA β . Na presença de M13, fA β 42 se desagrega.

[00243] **Fig. 7A** mostra que mudando a concentração de sal na fluorescência com ThT em 10 vezes (de 0,15 até 1,5 M) resulta numa diferença de 2-3 vezes na porcentagem de fA β que é desagregada. Isto indica que as interações hidrofóbicas são responsáveis pela maior parte a desagregação observada.

[00244] Em contraste com o efeito relativamente menor da concentração de sal, a **Fig. 7B** mostra que a mudança da temperatura de 4°C a 37°C resulta em uma diferença de 8-10 vezes na desagregação.

[00245] Esses resultados indicam que a desagregação de M13 é dependente de uma proteína que é mais ativa numa temperatura mais alta e que é relativamente insensível ao efeito do sal no ensaio,

empregando uma interação hidrofóbica. O fago g3p se encaixa nesta descrição. Seus domínios N1 e N2 são ligados por um ligante rico em glicina flexível que "abre" a ligação seguinte do N2 ao pilus F bacteriano. N1 fica então disponível para a ligação de um correceptor bacteriano como parte do processo de infecção. Espera-se que o aumento da temperatura no ensaio de desagregação "abra" os domínios N2 e N1 da g3p.

[00246] Embora a inativação do M13 numa alta temperatura (90°C, 10 minutos, vide a **Fig. 5**) anule a ligação, o aumento da temperatura de incubação no ensaio de ligação M13-amiloide tem um efeito positivo na ligação. **A Fig. 8A** mostra que o aumento da temperatura de 18°C para 58°C resulta numa ligação progressivamente melhor até cerca da T_M de desdobramento de dobradiça de cerca de 50°C, em cujo ponto a ligação começa a diminuir. Esta temperatura ideal de ligação é consistente com a temperatura do desdobramento de N1-N2 (a então denominada temperatura de fusão, ou T_M) na g3p, que é 48,1°C. O aumento da temperatura de incubação para 50°C vs 37°C também resulta numa ligação mais rápida do M13 ao fA β 42. **A Fig. 8B.**

Exemplo 5: g3p é necessária para a interação M13- β -amiloide

[00247] Para testar diretamente se a g3p é necessária para a interação M13- β -amiloide, a g3p foi removida do fago por tratamento proteolítico com ArgC (M13 Δ g3p) e o fago M13 Δ g3p comparado ao fago dobrado novamente para a ligação de A β . O tratamento com ArgC, uma protease de *Bacillus*, remove seletivamente as subunidades de g3p do fago. Os resultados são apresentados na **Fig. 9A**. O M13 redobrado novamente ainda compete como M13 do tipo selvagem no ensaio de ligação de competição, embora num nível diminuído. No entanto, nem mesmo 15 vezes de M13 Δ g3p competiram fracamente, se não nada com o M13 do tipo selvagem. Esta incapacidade em competir com o M13 do tipo selvagem é consistente

com uma perda de infectividade no fago M13Δg3p. **A Fig. 9B.** O tratamento com ArgC também causou uma perda da atividade de desagregação. **A Fig. 9C.**

[00248] Se a g3p estiver mediando a ligação de maneira análoga a seu papel na infecção, então os domínios N1 e N2 que são importantes para a infecção também deveriam competir com o M13 pela ligação. Para testar isso, o N1N2 recombinante solúvel ("rs-g3p(N1N2)"; "Construto 3") foi preparado e testado no ensaio de competição. Conforme mostrado na **Fig. 10A e 10B**, o M13 compete com o M13 marcado para a ligação ao fAβ42, mas o M13Δg3p não. Em contraste, o rs-g3p(N1N2) estava disponível para competir com M13, indicando que os domínios N1 e N2 de g3p são suficientes para a ligação β-amiloide. Resultados semelhantes foram obtidos em uma repetição do ensaio de competição. **Fig. 10B.**

Exemplo 6: mutações de desdobramento de dobradiça de g3p modulam a ligação a amiloide.

[00249] As mutações que afetam a capacidade da dobradiça entre os domínios N1 e N2 da g3p em abrir também deveriam afetar a capacidade do fago em portar essas mutações para competir com o M13 pela ligação ao Aβ. Eckert & Schmid, 2007, descreveram vários fagos variantes que foram usados para testar esta hipótese. A variante "AAA" (também conhecida como "3A") prejudica a ligação do pilus e diminui a estabilidade do domínio N2. AAA carrega as seguintes mutações em g3p: W181A, F190A e F194A. IIHY contém as mutações T13I, T101I, Q129H e D209Y, que estabiliza o domínio N2 e aumenta a T_M.

[00250] A competição de ligação foi avaliada para o fago fd, que tem a mesma sequência de aminoácidos que a g3p do M13 nos domínios N1 e N2 (**Fig. 2**); IIHY, que tem uma T_m de dobradiça maior do que M13, e AAA. Os fagos fd, AAA e IIHY foram pré-ativados a

50°C por 1,5 horas, em seguida os Fd, AAA, & IIHY ativados e não ativados foram comparados por sua capacidade em competir com o M13 marcado. **A Fig. 11** apresenta os resultados. O fd do tipo selvagem foi um competidor melhor quando ativado pelo aquecimento. Em contraste, o aquecimento teve pouco efeito sobre o IIHY, que tem uma T_m de dobradiça superior. O AAA, que diminuiu a estabilidade do domínio N2 em relação ao M13, foi um competidor melhor com ou sem pré-tratamento pelo calor.

[00251] Esses dados apoiam a conclusão de que a interação de M13 com β -amiloide é através de um mecanismo semelhante àquele pelo qual o M13 infecta bactérias. Primeiro, eles indicam que as interações hidrofóbicas são importantes para a interação M13- β -amiloide. Em segundo, a dependência de temperatura das atividades de ligação e desagregação de M13 refletem a T_m do desdobramento da dobradiça de N1-N2. Em terceiro, a proteólise de g3p anula as interações M13- β -amiloide.

Exemplo 7: Um fragmento de g3p se liga seletiva & potencialmente ao amiloide, mas não aos monômeros

[00252] Para avaliar se um fragmento de g3p retém a capacidade de se ligar ao amiloide, um fragmento de g3p compreendendo N1 e N2 foi preparado e avaliado por sua capacidade de se ligar às fibrilas A β versus aos monômeros A β pela ressonância plasmônica de superfície (SPR). Os resultados indicam que rs-g3p(N1N2) se liga preferencialmente às fibrilas A β ; ele não se liga aos monômeros A β . Estudos de ressonância plasmônica usando 4 μ M de rs-g3p(N1N2) são relatados na **Fig. 13**, que também mostra o K_D da ligação de rs-g3p(N1N2) como sendo de cerca de 160 nM. Esta interação de alta afinidade indica que um processo de ligação específico está ocorrendo entre rs-g3p(N1N2) e a fibra amiloide.

[00253] Os construtos adicionais foram avaliados por SPR. A tabela

abaixo resume os resultados.

Analitos	ka (1/M·s)	kd (1/s)	K_D
Construto 1 M13	2.6e3	9.2e-6	3,59 nM
Construto 3 rs-G3P(N1N2), 25°C	1.5e3	2.4e-4	0,15 uM
Construto 3 rs-G3P(N1N2), pré-aquecido a 37°C	4.1e3	2e-4	0,05 uM
Construto 4 proteína de fusão rs-g3p (N1N2)-hlgG4Fc, 25°C	1.75e4	1.28e-4	7,32 nM
Construto 5 proteína de fusão rs-g3p (N1N2)-hlgG4Fc, 25°C	1.52e4	1.66e-4	10,9 nM
Construto 6 proteína de fusão N1N2-IgG1Fc, 25°C	1.71e4	1.58e-4	9,2 nM

Exemplo 8: Um fragmento de g3p desagrega potencialmente as fibras Aβ42

[00254] Para testar se um fragmento de g3p pode desagregar as fibras amiloides, rs-g3p(N1N2) foi testado em um ensaio de fluorescência com ThT para sua capacidade de degradar as fibrilas fAβ42 pré-formadas. Os resultados indicam que o rs-g3p(N1N2) desagrega potencialmente o fAβ42. **A Fig. 14A** mostra os resultados deste experimento, que rs-g3p(N1N2) desagrega fAβ42 de uma forma dependente de dose. **A Fig. 14B** mostra a IC₅₀ como sendo aproximadamente 20 nM.

[00255] Em um experimento separado, o Aβ42 foi incubado com ou sem rs-g3p(N1N2) numa concentração de 2 μM por sete dias a 37°C e

a integridade das fibras A β 42 foi avaliada por micrografia eletrônica de transmissão. **A Fig. 15A** mostra os resultados deste experimento, que rs-g3p(N1N2) desagrega as fibras A β 42. **A Fig. 15B** relata os resultados de um ensaio com ThT nessas mesmas amostras. O rs-g3p(N1N2) degradou as fibras A β 42 pré-formadas neste ensaio com ThT.

Exemplo 9: o rs-g3p(N1N2) bloqueia a α -sinucleína e a montagem de A β e o rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc bloqueia a montagem e inibe a agregação de A β

[00256] Para determinar se a g3p pode bloquear montagem de fibra da α -sinucleína, e também para determinar se a valência (isto é, o número de cópias da g3p) desempenha um papel, um ensaio testando a capacidade da g3p pentamérica (5 cópias da g3p) e da g3p monomérica (uma cópia da g3p) em bloquear a atividade da α -sinucleína foi realizada. Os resultados mostram que a g3p bloqueia a montagem de fibra da α -sinucleína, e que a g3p pentamérica é mais eficiente do que a g3p monomérica nesta atividade. Vide a **Fig.16**.

[00257] A capacidade de rs-g3p(N1N2) (Construto 3) e rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (Construto 6) em inibir a montagem de A β 42 também foi avaliada. Conforme mostrado na **Fig. 30** e **Fig.31**, o Construto 3 e o Construto 6 são capazes de inibir a montagem de fA β 42 de uma forma dependente de dose. Conforme mostrado na **Fig. 37**, o Construto 3 e o Construto 6 são capazes de inibir a agregação de fA β 42.

Exemplo 10: a proteína de fusão rs-g3p(N1N2)-Ig se liga e desagrega o A β

[00258] Para avaliar se a valência da g3p desempenha um papel na potência da ligação de g3p ao amiloide, uma proteína de fusão de Ig que é bivalente para rs-g3p(N1N2) ("fusão de rs-g3p(N1N2)-Ig"), foi feita e comparada com o M13 pentavalente para sua capacidade de se

ligar às fibras A β . Conforme mostrado na **Fig. 17**, a fusão de rs-g3p(N1N2)-Ig se liga ao A β com afinidade semelhante ao M13, e mais potencialmente do que o rs-g3p(N1N2) sozinho, indicando que a valência da g3p pode ser importante. Resultados semelhantes foram obtidos em uma repetição do ensaio de competição. **Fig. 18**. Na **Fig. 18**, os quadrados representam o Construto 2 (M13); os triângulos representam o Construto 3 (rs-g3p(N1N2)); os triângulos de cabeça para baixo representam o Construto 4 (fusão de rs-g3p(N1N2)-Ig); e os diamantes representam um controle negativo de Fc de r-IgG4.

[00259] Para avaliar se a valência desempenha um papel ou não na desagregação, a fusão de rs-g3p(N1N2)-Ig bivalente ("Construto 4") foi comparada ao m13 pentavalente num ensaio de aprisionamento em filtro. **Fig. 19**. Os resultados indicam que a fusão de rs-g3p(N1N2)-Ig bivalente e o M13 pentavalente desagrega potencialmente as fibras β -amiloides. Também é indicado que a valência pode ser importante para a potência da desagregação, conforme indicado pela capacidade 1.7nM do M13 pentavalente em reduzir os agregados num nível semelhante a 40 nM da fusão de rs-g3p(N1N2)-Ig. **Fig. 19**.

[00260] Em um ensaio semelhante, 1×10^{12} /ml de M13 (Construto 2); 80 nM e 800 nM de rs-g3p(N1N2)-hIgG4-Fc (Construto 5); e 80 nM e 800 nM de rs-g3p(N1N2)-hIgG1-Fc (Construto 6) foram avaliados para sua capacidade em desagregar as fibras A β 42 em um ensaio de aprisionamento em filtro. Os Construtos 2, 5 e 6 potencialmente desagregam as fibras β -amiloides. **Fig. 33**.

Exemplo 11: A proteína estreptavidina-[biotina-g3p(N1N2)] tetramérica se liga e desagrega o fA β

[00261] Para avaliar ainda o papel da valência na capacidade da g3p em se ligar e desagregar o amiloide, uma estreptavidina tetramérica conjugada a g3p(N1N2) foi preparada, combinando-se rs-g3p(N1N2) com Biotina-Lys-NTA na presença de NiSO₄. O ligante em

excesso foi removido usando uma membrana de 3KDa de MWCO. A estreptavidina foi adicionada e rs-g3p(N1N2)-Biotina em excesso foi removido, usando uma membrana de 100 KDa de MWCO. O construto de g3p resultante, a estreptavidina-[biotina-g3p(N1N2)], tem quatro frações de rs-g3p(N1N2). A estreptavidina-[biotina-g3p(N1N2)] foi comparada a rs-g3p(N1N2) ("Construto 3") em um ensaio de ligação.

Fig. 20. A estreptavidina-[biotina-g3p(N1N2)] tetramérica se ligou a fA β mais potencialmente do que o rs-g3p(N1N2) monomérico, fornecendo uma indicação adicional de que a valência é importante para a potência de ligação. **Fig. 20.** No entanto, até mesmo o rs-g3p(N1N2) monomérico se ligou ao fA β em níveis terapeuticamente aceitáveis.

[00262] Para avaliar se a valência também desempenha ou não um papel na desagregação, o rs-g3p(N1N2) monomérico foi comparado à estreptavidina-[biotina-g3p(N1N2)] tetramérica num ensaio de aprisionamento em filtro. **Fig. 21.** Os resultados indicam que o rs-g3p(N1N2) monomérico e a estreptavidina-[biotina-g3p(N1N2)] tetramérica desagrega potencialmente as fibras fA β . Também está indicado que a valência pode ser importante para a potência de desagregação, conforme indicado pela capacidade superior de 360 nM de estreptavidina-[biotina-g3p(N1N2)] tetramérica em anular até 200 ng de agregados de fA β , em comparação à desagregação reduzida de A β por 2,5 μ M de rs-g3p(N1N2) monomérico. **Fig. 21**, linha 2 comparada à linha 4, por exemplo.

[00263] A desagregação de A β pela estreptavidina-[biotina-g3p(N1N2)] também foi avaliada por TEM. A estreptavidina-[biotina-g3p(N1N2)] desagregou completamente o fA β 42 após uma incubação de três dias. **Fig. 22.**

Exemplo 12: A proteína de fusão N1N2-Ig reduz significativamente o A β em um modelo murino da doença de Alzheimer

[00264] Usando um modelo de camundongo bem conhecido para

estudar a doença de Alzheimer (Hsiao et al., Science (1996) 274:99-102; Duyckaerts et al., Acta Neuropathol (2008) 115:5-38), camundongos Tg2576 machos foram envelhecidos para mais de 500 dias, injetados (2 µL/injeção) bilateralmente no hipocampo com duas preparações diferentes de fusões N1N2-Ig (Construto 5 em 7,8 µg/injeção e Construto 6 a 8,2µg/injeção) ou salina como um controle negativo, e sacrificados no dia 7. O tecido cerebral foi coletado, seccionado e corado para a quantificação de carga da placa, usando um anticorpo monoclonal beta antiamilóide (82E1; cat. # MBS490005-IJ10323 da MyBioSource). Conforme mostrado na **Fig. 28**, as proteínas de fusão N1N2-Ig reduziram significativamente a carga da placa medida no hipocampo, em comparação aos camundongos tratados com salina. Conforme mostrado na **Fig. 29**, as proteínas de fusão N1N2-Ig reduziram significativamente a carga da placa medida no córtex cerebral, em comparação aos camundongos tratados com salina.

Exemplo 13: A proteína de fusão N1N2-Ig bloqueia a citotoxicidade induzida pelo oligômero de Aβ.

[00265] Os oligômeros de Aβ causam a liberação de determinadas enzimas tóxicas nas células neuronais. A enzima pode ser avaliada para determinar se um composto pode inibir a citotoxicidade induzida pelo oligômero de Aβ. **A Fig. 32** apresenta dados representativos mostrando que o M13 (Construto 2) e o rs-g3p(N1N2)-hlgG1-Fc (Construto 6) bloqueiam a toxicidade induzida pelo oligômero às células N2a. Os fragmentos de g3p são potente inibidores da citotoxicidade induzida pelo oligômero de Aβ.

Exemplo 14: A proteína de fusão N1N2-Ig se liga e desagrega a tau

[00266] Para avaliar se um fragmento de g3p se liga à tau, uma proteína de fusão de fragmento de g3p-Ig compreendendo N1 e N2 foi

preparado e avaliado por sua capacidade de se ligar à ftau pela ressonância plasmônica de superfície (SPR). **A Fig. 35** mostra os resultados de um ensaio de SPR representativa, mostrando que o rs-g3p(N1N2)-hIgG4-Fc (Construto 4) se liga potencialmente à ftau.

[00267] Para testar se um fragmento da g3p pode desagregar a tau, uma proteína de fusão de fragmento g3p-Ig compreendendo N1 e N2 foi testada num ensaio de fluorescência com ThT para sua capacidade em degradar a ftau pré-formada. Os resultados indicam que uma proteína de fusão N1N2-Ig potencialmente desagrega a ftau. Vide, a **Fig. 36A** e a **Fig.36B**.

Exemplo 15: A proteína de fusão N1N2-Ig inibe o acúmulo de PrP^{Sc}, agregação e formação de PrP^{Sc} em um modelo de cultura de células da doença do príon (N2a22L^{Sc}).

[00268] As doenças do príon são caracterizadas pela conversão da proteína do príon celular normal (PrP^C) na forma patológica resistente à protease PrP^{Sc}. PrP^{Sc} é distinguido de PrP^C na base da resistência à protease: a protease degrada parcialmente a PrP^{Sc} para formar um fragmento de núcleo de terminal C resistente à protease (PrPres), que tem uma forma não glicosilada com um peso molecular de 19-21 kDa. A inibição, inversão e redução de PrP^{Sc} constitui uma abordagem terapêutica viável para o tratamento de diversas doenças degenerativas.

[00269] Para determinar se uma proteína de fusão de fragmento de g3p-Ig compreendendo N1 e N2 (Construto 6) interfere na formação dos confôrmeros de príon patológicos (PrP^{Sc}) em modelos *in vitro* da doença de príon, e para verificar a desagregação ou alteração na solubilidade de PrP em células N2a22L^{Sc} na presença ou ausência do Construto 6, as células foram cultivadas por 24h na ausência ou presença de 1 ug/ml do Construto 6 ou IgG e coletadas em tampão de lise. 100 µg de proteína total foram ultracentrifugados a 4°C por 90 min

a 55.000 rpm em um rotor TLA 100.1 em uma ultracentrífuga Beckman Optima TL. 25µl de amostras de péletes solubilizados e sobrenadantes foram submetidos a SDS-PAGE e à análise a jusante com anticorpo anti-PrP 6D11 mAb. A insolubilidade em detergente aumentada precede a aquisição da resistência à proteinase K (PK) por PrP^{Sc} ou mutantes de PrP, portanto a capacidade do Construto 6 em alterar a solubilidade de PrP foi avaliada. As células tratadas com o Construto 6 exibiram quantidades significativamente reduzidas de PrP agregado-insolúvel em comparação às células N2a22L^{Sc} tratadas com IgG. Vide a **Fig. 38A** e **Fig. 38B**.

[00270] Para as **Figuras 38A** e **38B**, as células N2a22L^{Sc} foram geradas conforme descrito previamente (Pankiewicz et al., Eur. J. Neurosci. (2006) 23:2635-2647. Brevemente, cérebros de camundongos CD-1 terminalmente doentes infectados com cepa de príon 22L adaptada para camundongo foram homogeneizados por sonicação (10% em peso/volume) em salina tamponada com fosfato frio e dextrose 5% em condições estéreis. Para a infecção, o homogeneizado de cérebro foi ainda diluído a 2% em Opti-MEM e adicionado a placas de seis poços subconfluente (Corning, Acton, MA, USA), 1 mL por poço de 10-cm². Após 5 h, 1 mL de MEM regular foi adicionado e as células foram incubadas na presença do homogeneizado de cérebro infeccioso por 12 h adicionais. As células são lavadas e o meio de crescimento MEM padrão é adicionado. As células foram cultivadas até confluírem e em seguida separadas em diluições de 1:2 e transferidas para frascos de 25-cm² (Corning). As células cultivadas em um dos frascos foram separadas 1:2 a cada 4 dias para gerar passagens subsequentes, enquanto que as células cultivadas no outro frasco foram colhidas e homogeneizadas para monitorar o nível de PrP^{Sc}. Com base em estudos anteriores, a presença de inóculo derivado de PrP^{Sc} é apenas detectado na primeira

e segunda passagens, assim as células da passagem 4 (P4) foram utilizadas para todos os estudos subsequentes. As células foram lisadas em um tampão de homogeneização composto de (50 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM de NaCl, 1 mM de ácido tetra-acético de etilenoglicol (EGTA), 1 mM de Na_3VO_4 , 1 mM de NaF, 2,5 mM de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 1 mM de β -glicerofosfato, NP-40 1%, desoxicolato de sódio 0,25%, 0,5 mM de fluoreto de fenilmetilssulfonil (PMSF), 1 mM de leupeptina, 1 mM de pepstatina A, 1 mM) ou sem PMSF para a digestão de pela PK) por 5 min a 4°C e os materiais insolúveis foram removidos por centrifugação a 10.000 g por 10 min a 4°C. Para o fracionamento celular, 100 µg de proteína foram rotacionados a 55.000 rpm por 90 min, após o que o pélete foi reconstituído no volume inicial. 20% do pélete e do sobrenadante foram dissolvidos novamente e caracterizados bioquimicamente.

[00271] Para verificar se o Construto 6 altera, de forma dependente da dose, a propagação de PrP^{Sc} , pela desagregação ou alteração de suas propriedades físico-químicas, as células $\text{N2a22L}^{\text{Sc}}$ foram cultivadas por 24 h na ausência ou presença de concentrações crescentes do Construto 6 ou IgG e coletadas em tampão de lise. As alíquotas das células lisadas com e sem o tratamento com PK foram submetidas a SDS-PAGE e à análise a jusante com o anticorpo anti-PrP 6D11 e mAb 6H4. A imunorreatividade de PrP no lisado não digerido e digerido por PK bioquimicamente dissolvida novamente das células tratadas com o Construto 6 e IgG Controle foi avaliada. Tratamentos incluídos: $\text{N2a22L}^{\text{Sc}}$ + 10µg/ml, 3µg/ml, 1µg/ml, 0,333µg/ml, 0,111µg/ml, 0,037µg/ml, 0,012µg/ml, e 0,004µg/ml do Construto 6, ou $\text{N2a22L}^{\text{Sc}}$ + 1µg/ml de mIgG.

[00272] Os resultados indicam que uma diminuição significativa dependente da dose no PrP^{Sc} na presença do Construto 6, com 50% a menos de PrP^{Sc} gerado na presença de 0,08ug/ml do Construto 6,

comparado a 1ug/ml de IgG. Vide a **Fig. 39A** e **Fig. 39B**. Os experimentos repetidos confirmam esses resultados.

[00273] Para avaliar o confômero resistente à proteinase K de PrP, alíquotas de células lisadas foram tratadas com PK (1µg/µg), diluição de 1:50 a 37°C por 30 min, de acordo com métodos anteriores (Perrier et al., J. Neurochem (2004) 84:454-463, Pankiewicz et al., 2006). Após a incubação, a digestão é interrompida pela adição de PMSF a 4 mM.

[00274] As concentrações de proteína foram determinadas usando o kit de ensaio de proteína BCA (Pierce). As amostras foram diluídas em tampão de amostra (250 mM de Tris-HCl, pH 6,8, SDS 10%, 5 mM de β-mercaptoetanol, glicerol 50%, coomassie blue G250 0,02%) e fervidas por 5 min. As amostras processadas foram dissolvidas novamente por SDS-PAGE sob condições de redução.

[00275] O anticorpo monoclonal anti-PrP 6D11 (vide Sadowski et al., Neurobiol Dis. (2009) 34(2): 267-278) e 6H4 (vide Cordes et al., J Immunol Methods (2008) 337:106-120), bem como o antiactina foram usados para caracterizar as amostras. Os complexos antígeno-anticorpo foram detectados usando IgG anticamundongo conjugada à peroxidase de rábano silvestre (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK) e visualizados usando o sistema ECL (GE Healthcare UK Limited) seguindo as instruções do fabricante. A quantificação das bandas das proteínas foi realizada por análise densitométrica das películas (Image J, NIH).

[00276] Tomados em conjunto, os resultados mostrados nas **Figuras 38A e 38B** e **Figuras 39A e 39B** demonstram a capacidade de uma proteína de fusão de Ig ao fragmento de g3p em inibir diretamente a formação de PrP^{Sc} *in vitro*.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica para uso no tratamento de uma doença associada com a proteína amiloide agregada e/ou com alteração conformacional, caracterizada pelo fato de que compreende um veículo farmaceuticamente aceitável e um polipeptídeo ou uma proteína de fusão que compreende o polipeptídeo fundido a um domínio de proteína ao qual não é normalmente associado; sendo que o polipeptídeo se liga à amiloide e compreende pelo menos uma proteína de gene 3 (g3p) do tipo selvagem, fragmento de ligação à amiloide da g3p do tipo selvagem, g3p mutante ou variante ou fragmento de ligação à amiloide de g3p mutante ou variante; e sendo que a composição não compreende bacteriófago.

2. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo compreende um fragmento de ligação à amiloide de g3p do tipo selvagem de domínio N2 ou mutante ou variante.

3. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo compreende a g3p do tipo selvagem do domínio N2 inteiro ou mutante ou variante.

4. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo compreende adicionalmente um fragmento de g3p do tipo selvagem do domínio N1 ou mutante ou variante.

5. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo compreende um fragmento N1-N2 de g3p do tipo selvagem ou mutante ou variante.

6. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo compreende g3p mutante ou do tipo selvagem.

7. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo compreende adicionalmente um veículo ligado covalentemente ou não covalentemente ao polipeptídeo.

5 8. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que a g3p do tipo selvagem ou o fragmento de ligação à amiloide da g3p do tipo selvagem é idêntico à sequência de aminoácidos da porção correspondente de SEQ ID NO:1.

10 9. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de que a sequência de aminoácidos da g3p mutante ou variante ou do fragmento de ligação à amiloide da g3p mutante ou variante é pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou
15 pelo menos 98% idêntica à sequência de aminoácidos da porção correspondente de SEQ ID NO:1.

 10. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo compreende um fragmento N1-N2 da g3p, em que a região de dobradiça de N2 é mu-
20 tada para resultar em um polipeptídeo com dobradiça reduzida Tm e maior afinidade quando comparado a um polipeptídeo de fago M13 do tipo selvagem correspondente.

 11. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de que com-
25 preende uma proteína de fusão, em que o polipeptídeo compreende pelo menos uma g3p do tipo selvagem, um fragmento de ligação à amiloide da g3p do tipo selvagem, a g3p mutante ou variante ou o fragmento de ligação à amiloide da g3p mutante ou variante é fundido a um domínio de proteína que compreende uma região constante de
30 imunoglobina.

12. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que a região constante de imunoglobina é um fragmento Fc.

5 13. Composição farmacêutica, de acordo com as reivindicações 11 ou 12, caracterizada pelo fato de que a região constante de imunoglobina é selecionada a partir do fragmento Fc de uma IgG1, uma IgG2, uma IgG3, uma IgG4 e uma IgM.

10 14. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizada pelo fato de que o uso compreende tratar uma doença associada com alteração conformacional e/ou agregação de amiloide.

15 15. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizada pelo fato de que o uso compreende tratar uma doença selecionada a partir de mal de Alzheimer, mal de Alzheimer de início precoce, mal de Alzheimer de início tardio, mal de Alzheimer pré-sintomático, doença de Parkinson, amiloidose SAA, síndrome islandesa hereditária, senilidade, mieloma múltiplo, doenças de príon, kuru, doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), doença de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), insônia familiar fatal (FFI), paraplexia enzoótica, encefalite espongiforme bovina (BSE), esclerose lateral amiotrófica (ALS), ataxia espinocerebelar (SCA1, SCA3, SCA6 e SCA7), doença de Huntington, atrofia dentatorubral-pailidoluisiana, atrofia muscular espinhal e bulbar, angiopatia amiloide cerebral hereditária, amiloidose familiar, demência do lobo frontotemporal, demência britânico/dinamarquesa e encefalopatia familiar.

20

25

16. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizada pelo fato de que o uso compreende tratar um paciente que é positivo para o biomarcador florbetapir quando aquele biomarcador é usado como um agente de imagem em tomografia por emissão de pósitrons.

30

17. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizada pelo fato de que o uso compreende tratar a doença de Parkinson, o mal de Alzheimer ou a doença de Huntington.

5 18. Composição para uso para detectar ou gerar imagem de amiloide agregada, caracterizada pelo fato de que compreende um marcador detectável fixado a um polipeptídeo que se liga à amiloide ou uma proteína de fusão que compreende o polipeptídeo fundido a um domínio de proteína ao qual não é normalmente associado; sendo que
10 o polipeptídeo compreende uma g3p do tipo selvagem, um fragmento de ligação à amiloide da g3p do tipo selvagem, uma g3p mutante ou variante ou um fragmento de ligação à amiloide da g3p mutante ou variante.

15 19. Composição, de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que o marcador é um radiomarcador escolhido a partir de ^{18}F , ^{11}C ou ^{123}I .

20 20. Composição, de acordo com a reivindicação 18 ou 19, caracterizada pelo fato de que o uso compreende o diagnóstico de uma doença ou distúrbio associado à amiloide.

20 21. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um marcador detectável unido a um polipeptídeo que se liga à amiloide ou uma proteína de fusão que compreende o polipeptídeo fundido a um domínio de proteína ao qual não é normalmente associado; sendo que o polipeptídeo compreende uma g3p do tipo selvagem, um
25 fragmento de ligação à amiloide da g3p do tipo selvagem, uma g3p mutante ou variante ou um fragmento de ligação à amiloide da g3p mutante ou variante; e sendo que o polipeptídeo não compreende um bacteriófago.

30 22. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um polipeptídeo que se liga à amiloide fundido a pelo menos um

domínio de proteína a qual não é normalmente associado; sendo que o polipeptídeo compreende uma g3p do tipo selvagem, um fragmento de ligação à amiloide da g3p do tipo selvagem que compreende todo o domínio N2, um mutante ou variante da g3p ou um fragmento de ligação à amiloide da g3p mutante ou variante que compreende todo o domínio N2 da g3p; sendo que o mutante ou variante difere da porção correspondente da g3p do tipo selvagem somente pela substituição e/ou inserção de aminoácido.

23. Composição, de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que a g3p mutante ou variante ou do tipo selvagem ou o fragmento de ligação à amiloide da g3p do tipo selvagem ou mutante ou variante é fundida a uma proteína selecionada a partir de
- a) uma região constante de imunoglobina;
 - b) uma fragmento Fc de imunoglobina;
 - 15 c) um fragmento Fc de IgG; ou
 - d) um fragmento Fc de IgM.

24. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um veículo farmaceuticamente aceitável e uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polipeptídeo que se liga à amiloide, sendo que o polipeptídeo compreende uma g3p do tipo selvagem, um fragmento de ligação à amiloide da g3p do tipo selvagem que compreende todo o domínio N2 ou mutante ou variante da g3p, ou fragmento de ligação à amiloide ou g3p mutante ou variante que compreende todo o domínio N2; e sendo que o polipeptídeo não compreende um bacteriófago.

25. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de que o fragmento de ligação à amiloide compreende todos os domínios N1-N2 da g3p do tipo selvagem ou mutante ou variante.

26. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindica-

ção 24 ou 25, caracterizada pelo fato de que a sequência de aminoácidos da g3p mutante ou variante ou fragmento de ligação à amiloide da g3p mutante ou variante é pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98% idêntica a uma porção correspondente de SEQ ID

5 NO:1.

27. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um fago filamentoso isolado que expressa uma g3p mutante ou variante para uso na redução de amiloide, na inibição de formação de amiloide, na inibição de agregação de amiloide ou na re-
10 moção e/ou prevenção da formação de oligômeros tóxicos em um paciente que necessita da mesma.

28. Uso de uma composição como definida na reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de um kit para detectar amiloide em uma amostra biológica.

15 29. Uso, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo é uma proteína de fusão.

30. Uso, de acordo com a reivindicação 28 ou 29, caracterizado pelo fato de que o marcador é detectado por tomografia por emissão de pósitrons (PET).

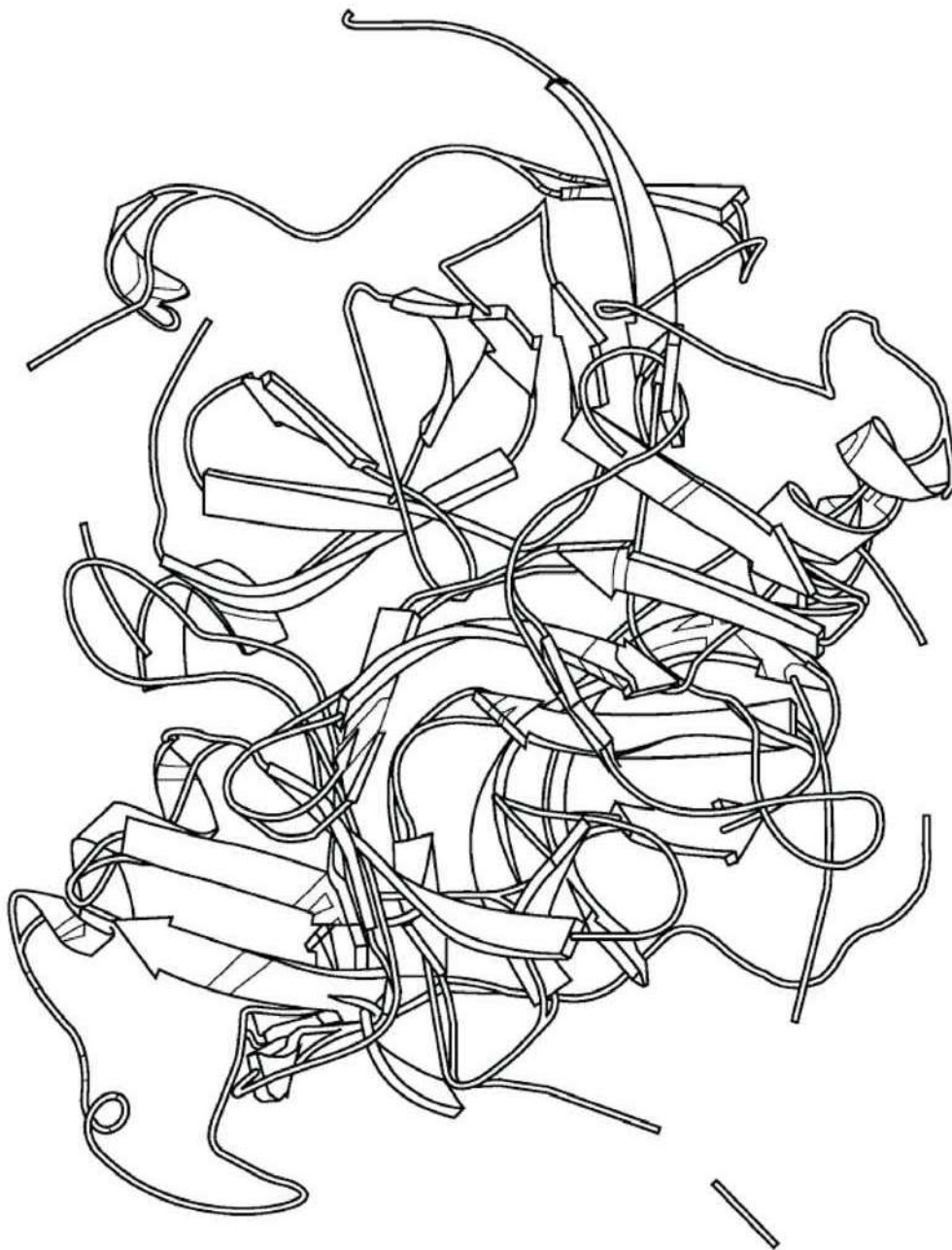


FIG. 1

M13-	MKKLLFAIPLVVPFYSHSAETVESCLAKPHTENSFTNVWKDDKTLDRYANYEGCLWNATG	60
Fd-	-----	60
F1-	-----	60
Con	MKKLLFAIPLVVPFYSHSAETVESCLAKPHTENSFTNVWKDDKTLDRYANYEGCLWNATG	
M13-	VVVCTGDETQCYGTWVPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGTPPEYGDTPIPGYTY	120
Fd-	-----	120
F1-	-----	120
Con	VVVCTGDETQCYGTWVPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGTPPEYGDTPIPGYTY	
M13-	INPLDGYTPPGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNRQGALTVYTGTVTQGTDPV	180
Fd-	-----	180
F1-	-----	180
Con	INPLDGYTPPGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNRQGALTVYTGTVTQGTDPV	
M13-	KTTYQYTPVSSKAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGQSSDLPQPPVNAGGGSG	240
Fd-	-----	240
F1-	-----	240
Con	KTTYQYTPVSSKAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGQSSDLPQPPVNAGGGSG	
M13-	GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGDFDYEKMANANKGAMTENADENALQS	300
Fd-	-----	300
F1-	-----	300
Con	GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGDFDYEKMANANKGAMTENADENALQS	
M13-	DAKGKLDVATDYGAAIDGFIGDVSGLANGNGATGDFAGSNSQMAQVGDGDN SPLMNNFR	360
Fd-	-----	360
F1-	-----	360
Con	DAKGKLDVATDYGAAIDGFIGDVSGLANGNGATGDFAGSNSQMAQVGDGDN SPLMNNFR	
M13-	QYLPSLPQSVECRPFVFSAGKPYEFSIDCDKINLFRGVFAFLLYVATFMYVFSTFANILR	420
Fd-	-----Y--G-----	420
F1-	-----G-----	420
Con	QYLPSLPQSVECRPX--XAGKPYEFSIDCDKINLFRGVFAFLLYVATFMYVFSTFANILR	
M13-NKES	424 {SEQ ID NO:1}	
Fd-	---- 424 {SEQ ID NO:2}	
F1-	---- 424 {SEQ ID NO:3}	
Con NKES	(SEQ ID NO:4)	

FIG. 2A

```

I2-2MKRKIIAISLFLYIPLSNADNWESITKSYTGFAMSKTVESKDQDGKTVRKEVITQADLT 60
Ike -----I-----K---P----- 60
Con MKRKIIAISLFLYIPLSNADNWESITKSYTGFAXSKTVESKDXDGKXVRKEVITQADLT

I2-2TACNDAKASAQDVFNQMKLTFSGIWPDSQFRLVTGDTCVYNGSPSEKTESWSIRAQVEGD 120
Ike -----N---I---L--T-N-----G----- 120
Con TACNDAKASAQXVFNQXKLTXSGXWXSQFRLVTGDTCVYNGSPXEKTESWSIRAQVEGD

I2-2MQRSVPDEEPSEQTP EEICEAKPPIDGVFNNVSKGDEGGFYINYNGCEYEATGVTVCQND 180
Ike I-----F----- 180
Con XQRSVPDEEPSEQTP EEICEAKPPIDGVFNNVXKGDEGGFYINYNGCEYEATGVTVCQND

I2-2GTVCASSAWKPTGYVPESGESSSSPVKDGDTGGTGE GSDTGGDTGGGDTGGGSTGGDTG 240
Ike ----S-----P----L----- 240
Con GTVCXSSAWKPTGYVPESGEXSSSPXKDGDTGGTGE GSDTGGDTGGGDTGGGSTGGDTG

I2-2GSTGGGSTGGGSTGGSTGKSLTKEDVTAAIH DASP SIGDAVKDSL TEDNDQNDNQKKADE 300
Ike --S---S-----V-----Y----- 300
Con GSXGGGSXGGGSXGGSTGKSLTKEDVTAAIHXASP SIGDAVKDSL TEDNDQXDNQKKADE

I2-2QSAKASASVSDAISDGMRGVGNFVDDLGGESSQY GIGNSEMDLSVSLAKGQLGIDLEGHG 360
Ike -----F-----T-----R----- 360
Con QSAKASASVSDAISDGMRGVGNFVDDXGGESSQY GXGNSEMDLSVSLAKGQLGIDXEGHG

I2-2SAWESFLNDGALRPSIPSGH GCTDFVMFQGSVYQLDIGCDKLGD IKSVL SWVMYCLTFWY 420
Ike -----T-----N---Y-----IE-----NDIKSVL SWVMYCLTFWY 420
Con SAWESFLNDGALRPSIPXGH GCTXFVMXQGSVYQXXIGCDKLXDIKSVL SWVMYCLTFWY

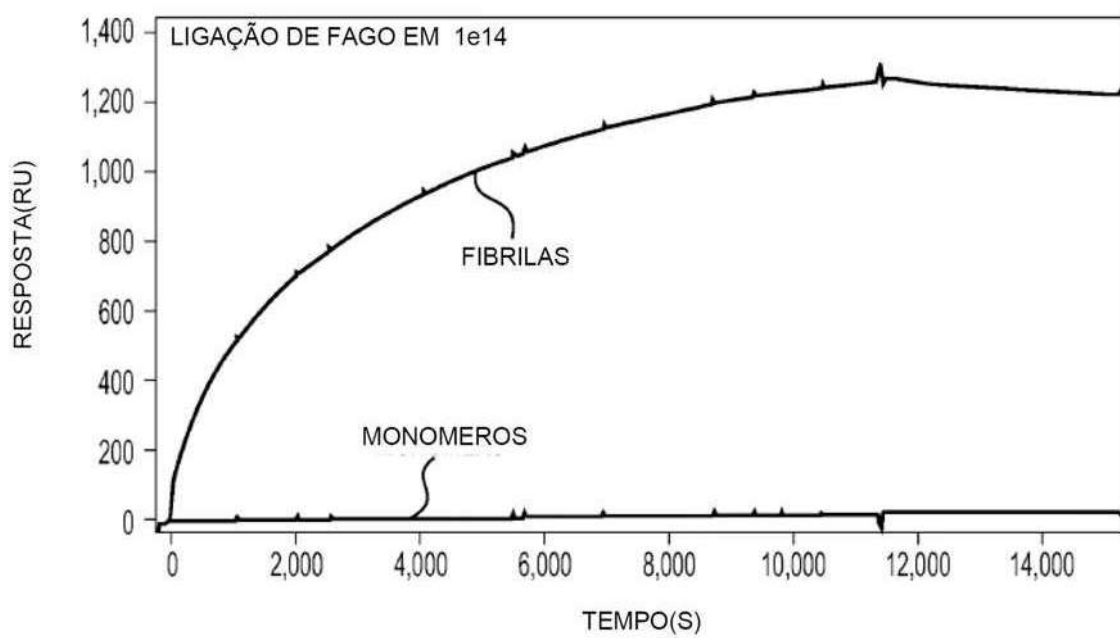
I2-2VFQSATSLLRKGEQ 434 (SEQ ID NO:5)
Ike ----V----- 434 (SEQ ID NO:6)
Con VFQSXTSLLRKGEQ (SEQ ID NO:7)

```

FIG. 2B

MKKIIIALFFAPFFTHATDAECLSKPAFDGTLNVWKEGDSRYANFENCIYELSGIGIG 60
YDNDTSCNGHWTPVRAADGSGNGGDDNSSGGGSNGDSGNNSTPDTVTPGQTVNLPSDLST 120
LSIPANVVKSDSIGSQFSLYTNASCTMCSGYLLSNNADSIANITETVKADYNQPDMMWF 180
EQTDSDGNHVKILQNSYKAVSYNVESKQSDVNNPTYINYSYSVNVKQVSYDTSNVCIMNW 240
ETFQNKCDASRAVLITDTVTPSYSRNITIQSNINYQGSNGSGGSGGSGGSGNDGGGTGNN 300
GNGTGDFDYVKMANANKDALTESFDLSALQADTGASLDGSVQGTLDLSLGFSDSIGGLVG 360
NGSAISGEFAGSSAAMNAIGEGDKSPLLDLSLFLKDGLFPALPEFKQCTPFVVFAPGKEYE 420
FIIECKYIDMFKGIFAFILYFWTFVTVYDSFSGILRKGRG (SEQ ID NO:8) 460

FIG. 2C

**FIG. 3A**

PARAMETRO	VALOR
K_a	2572 (6)
K_d	9.234E-6
K_D	3.589 (8) nM

FIG. 3B

A LIGAÇÃO É DEPENDENTE DE CONCENTRAÇÃO

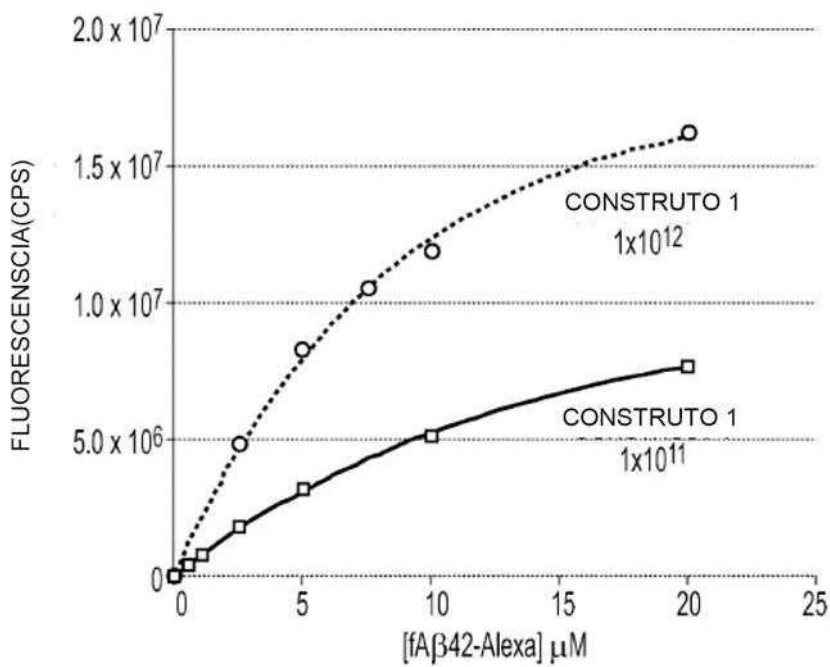


FIG. 4A

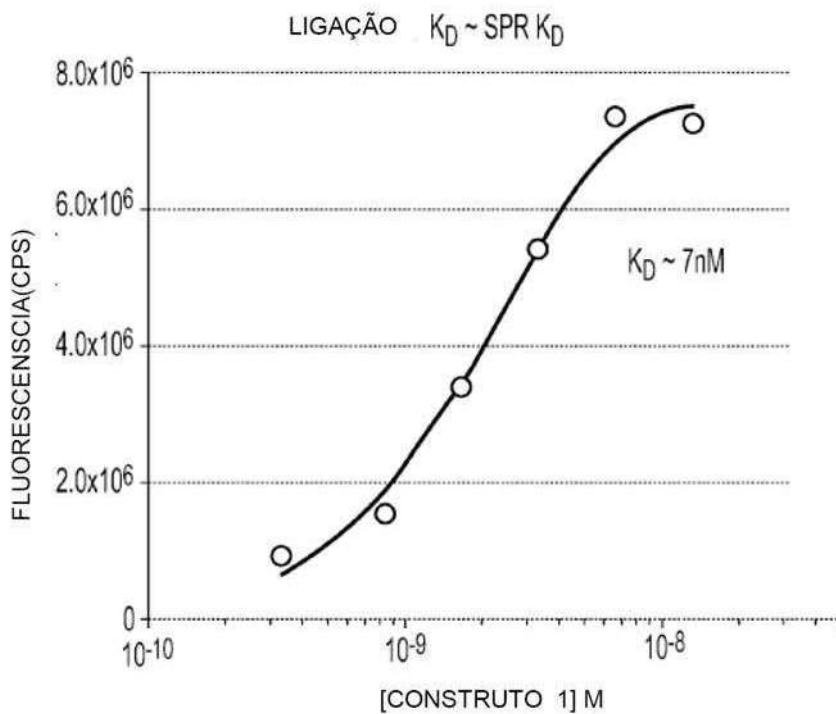


FIG. 4B

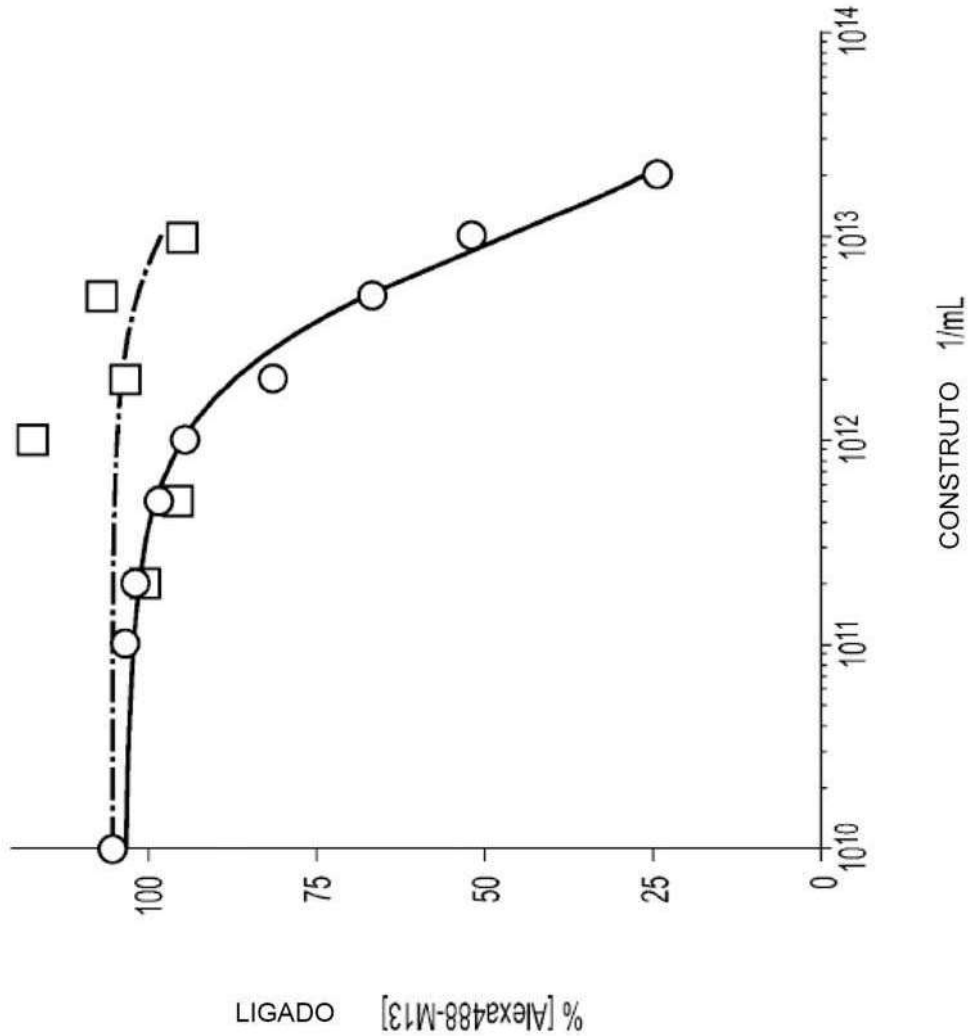


FIG. 5

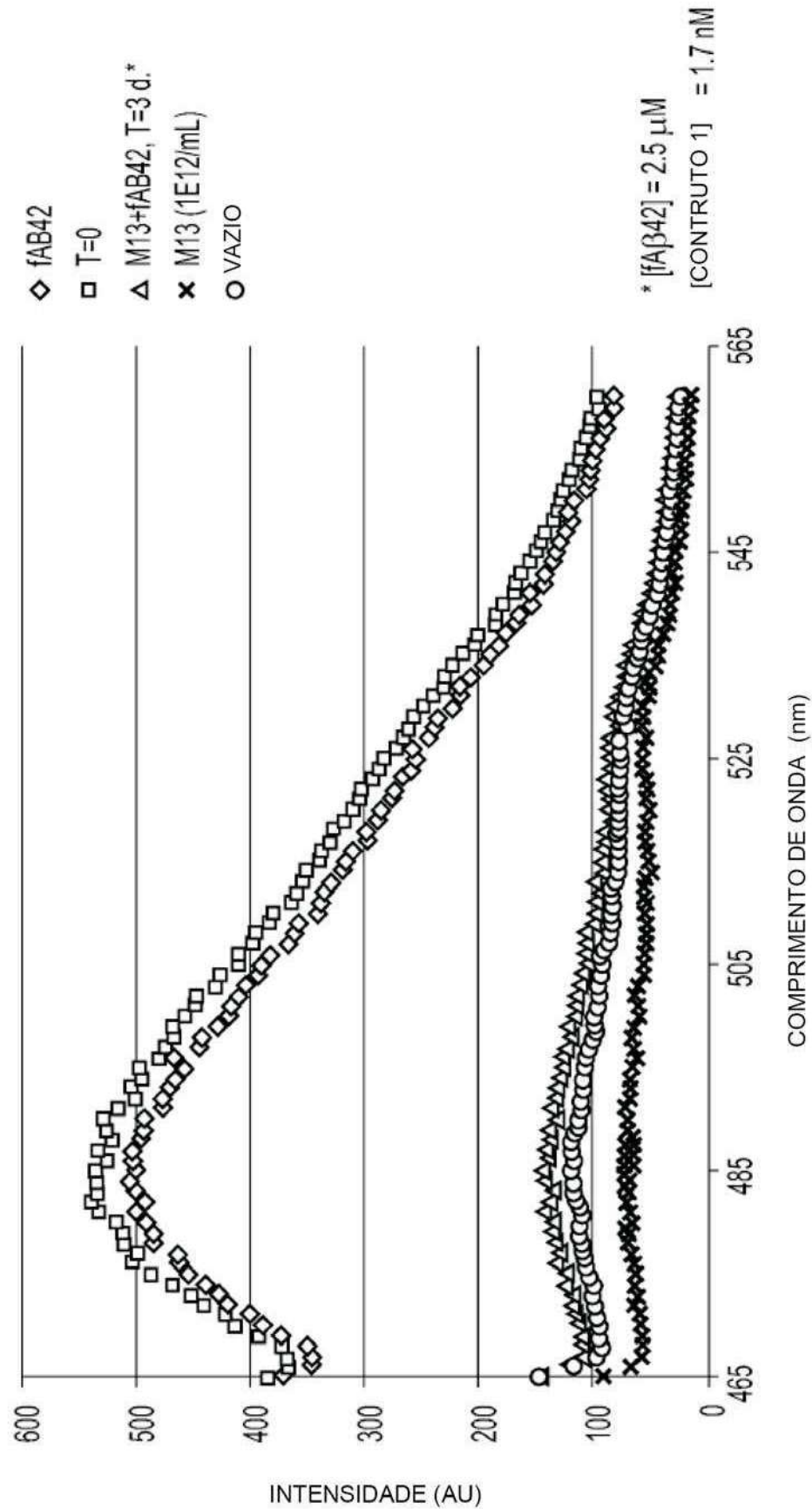


FIG. 6

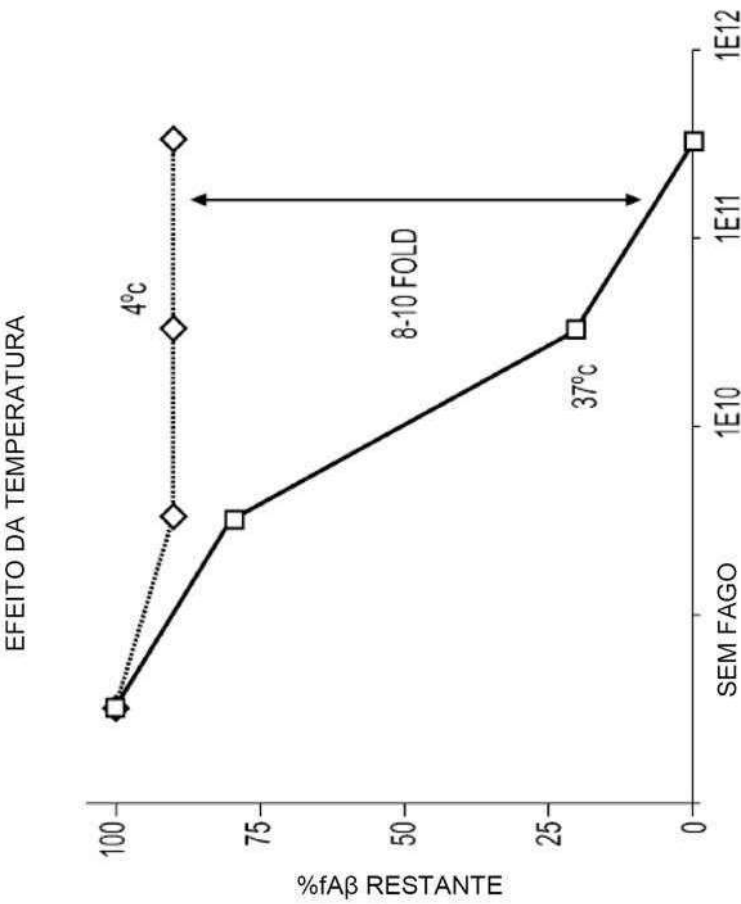


FIG. 7A

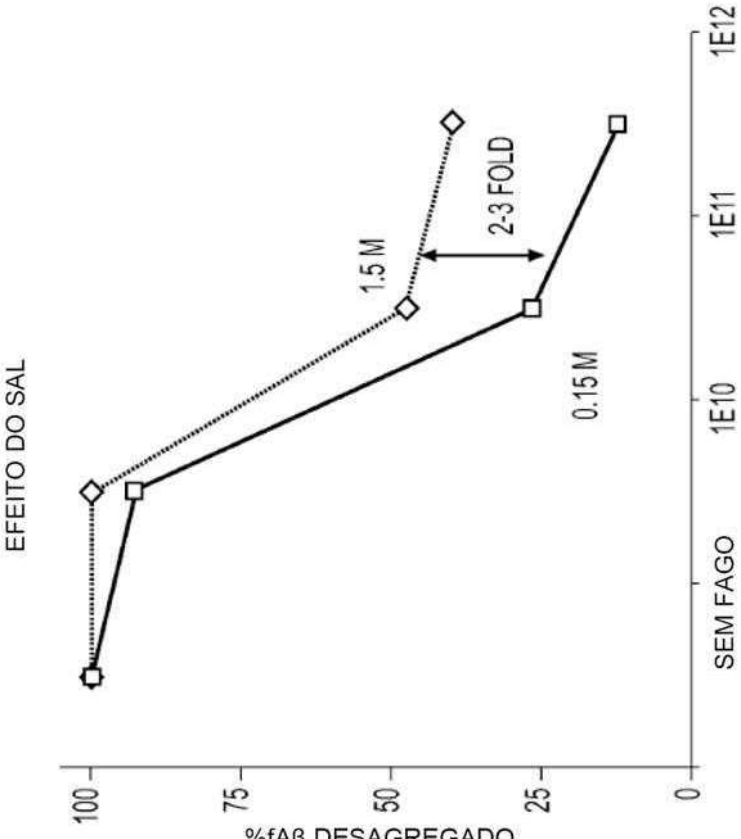
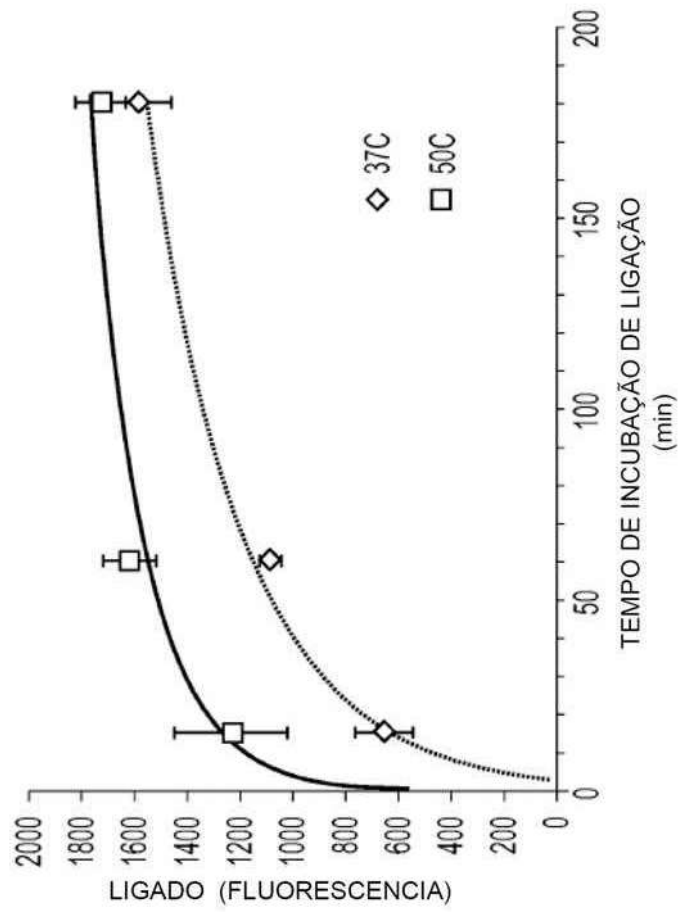
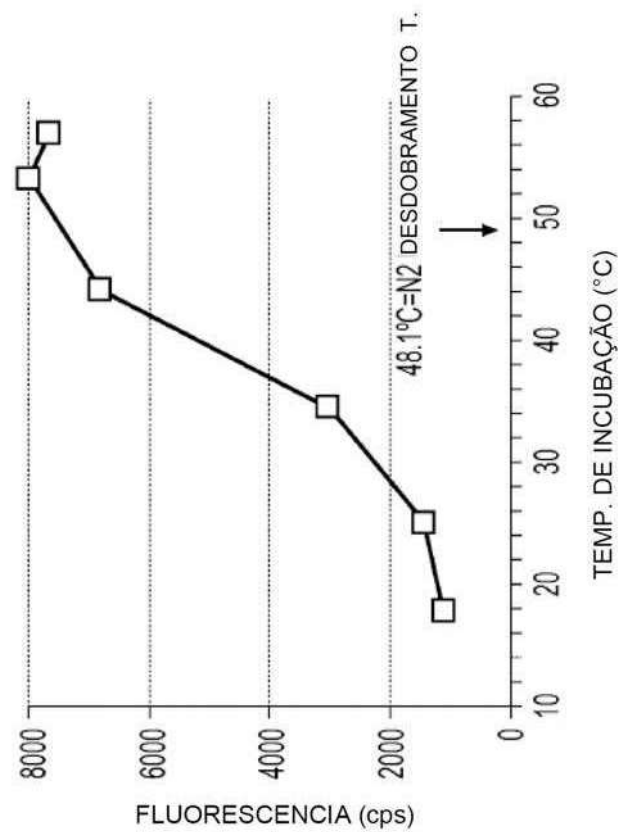
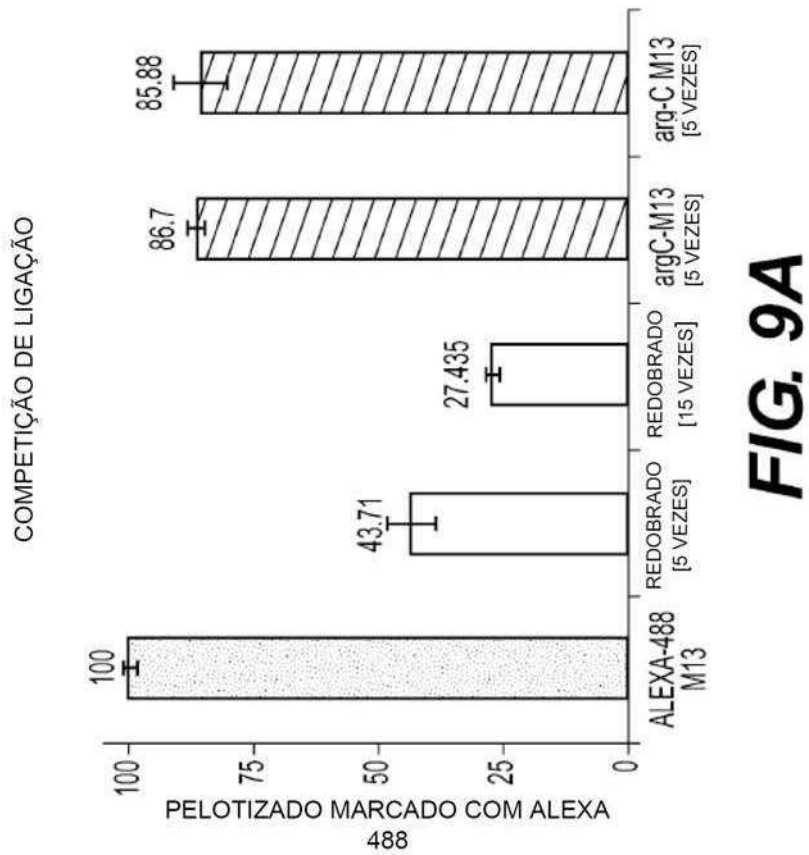
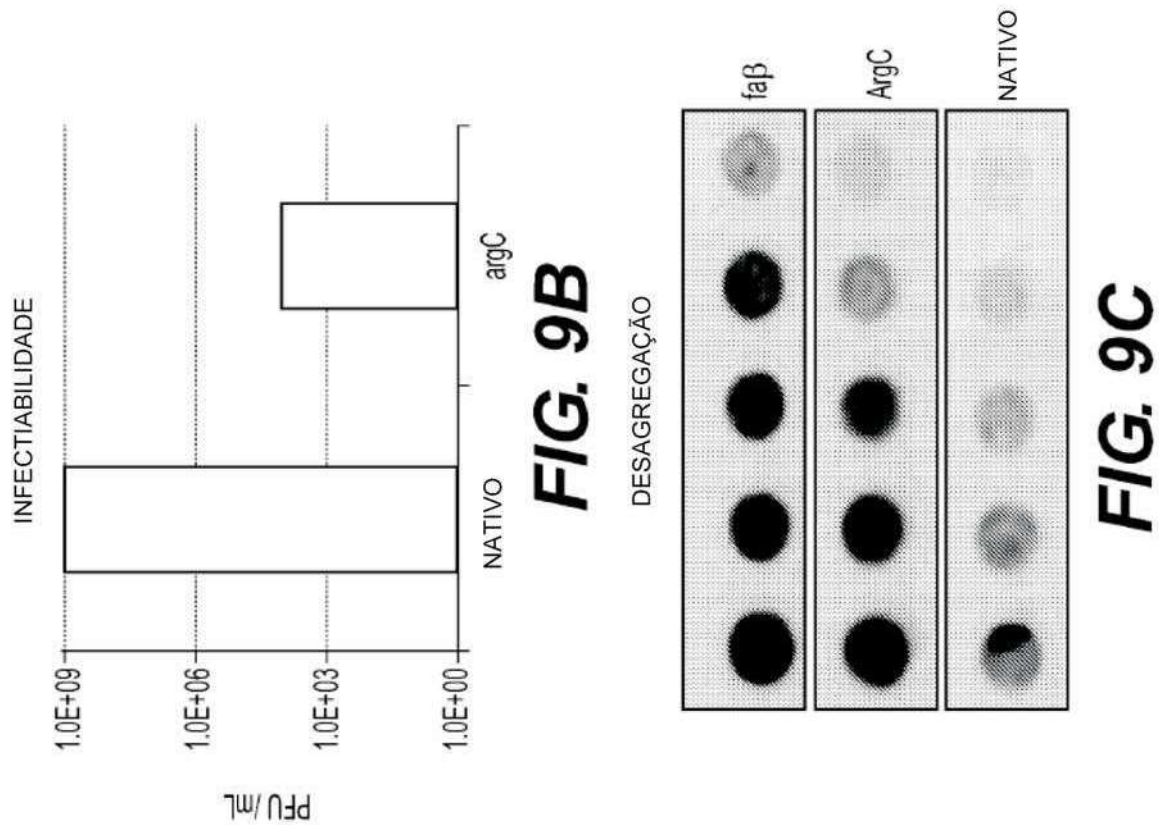
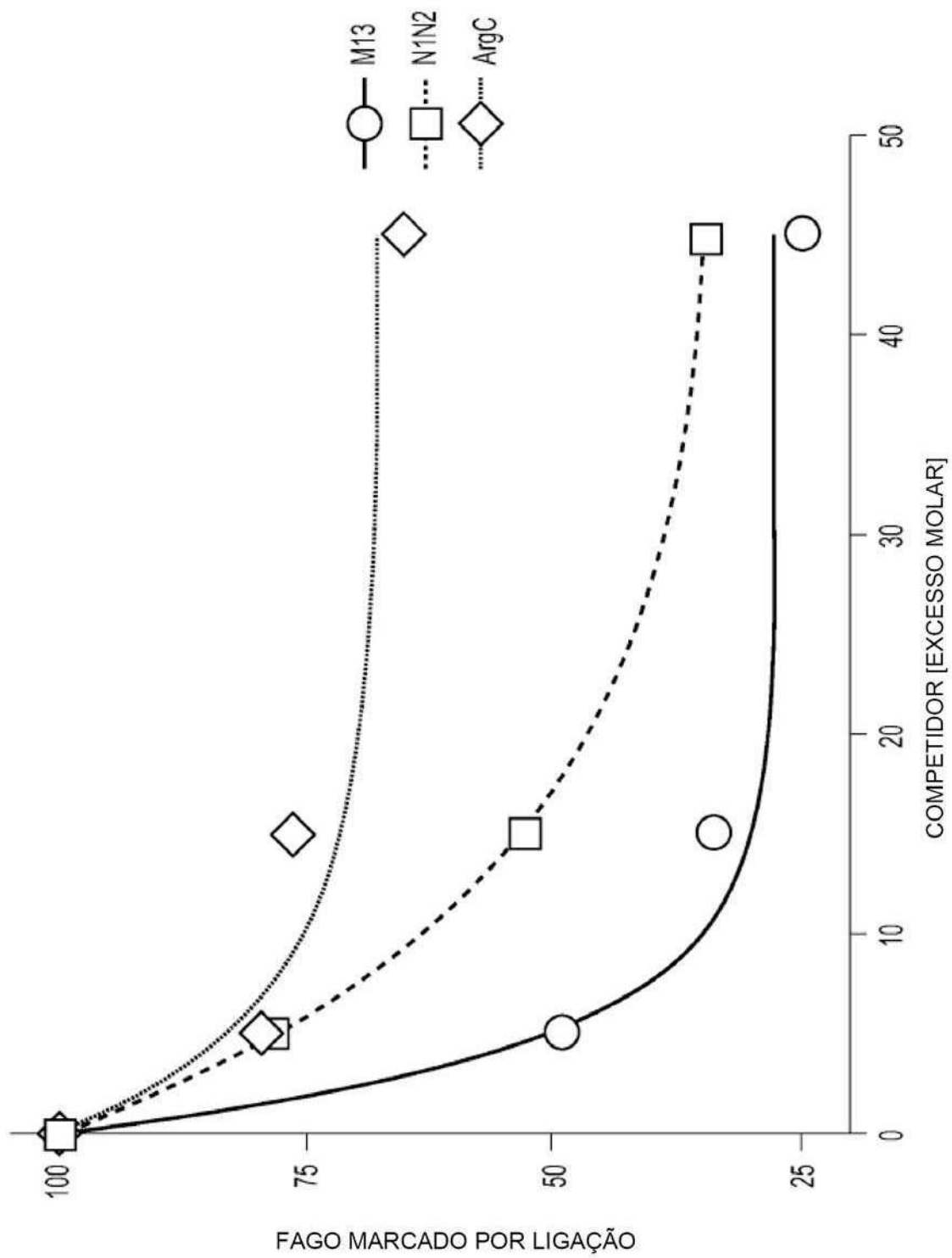
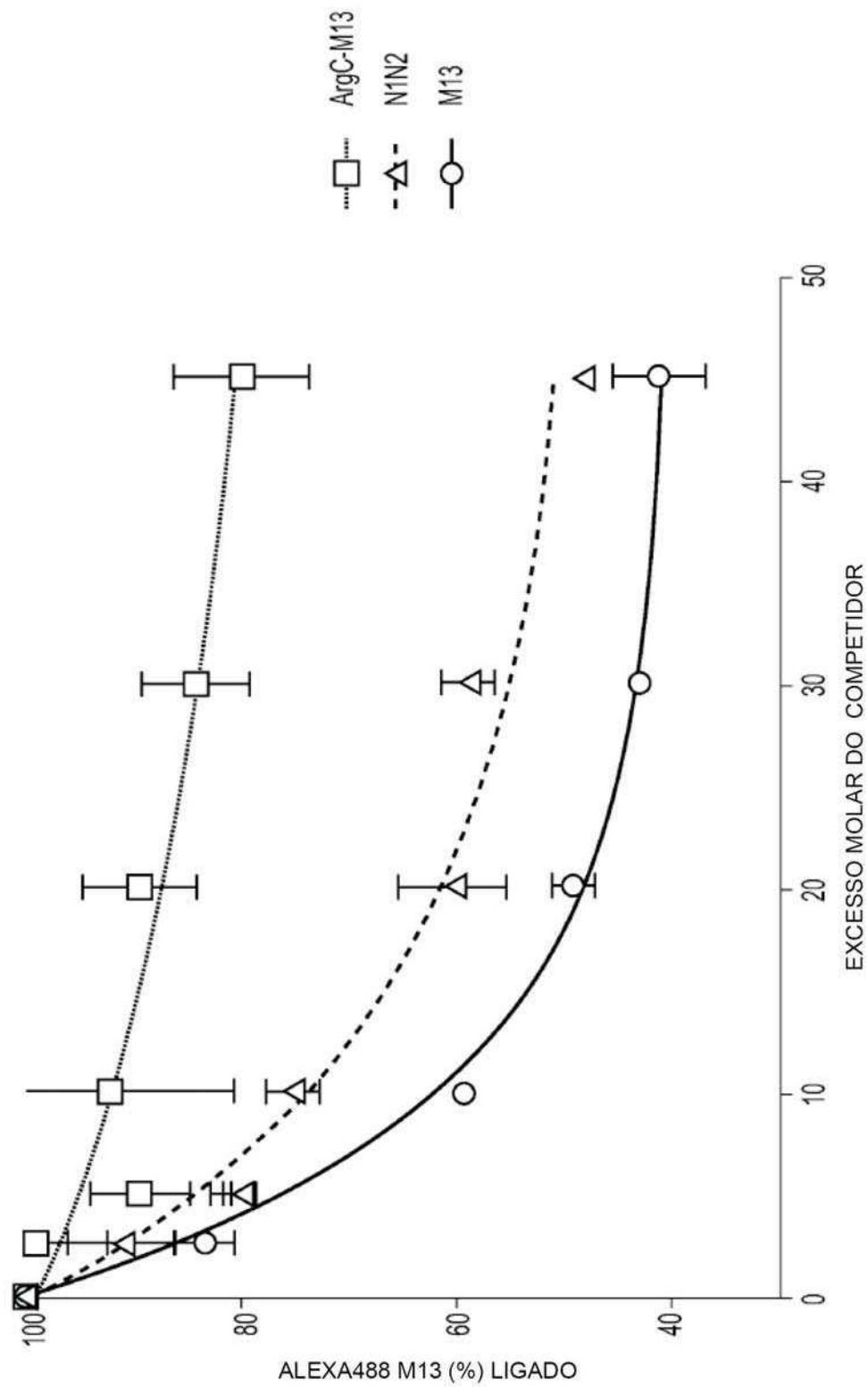


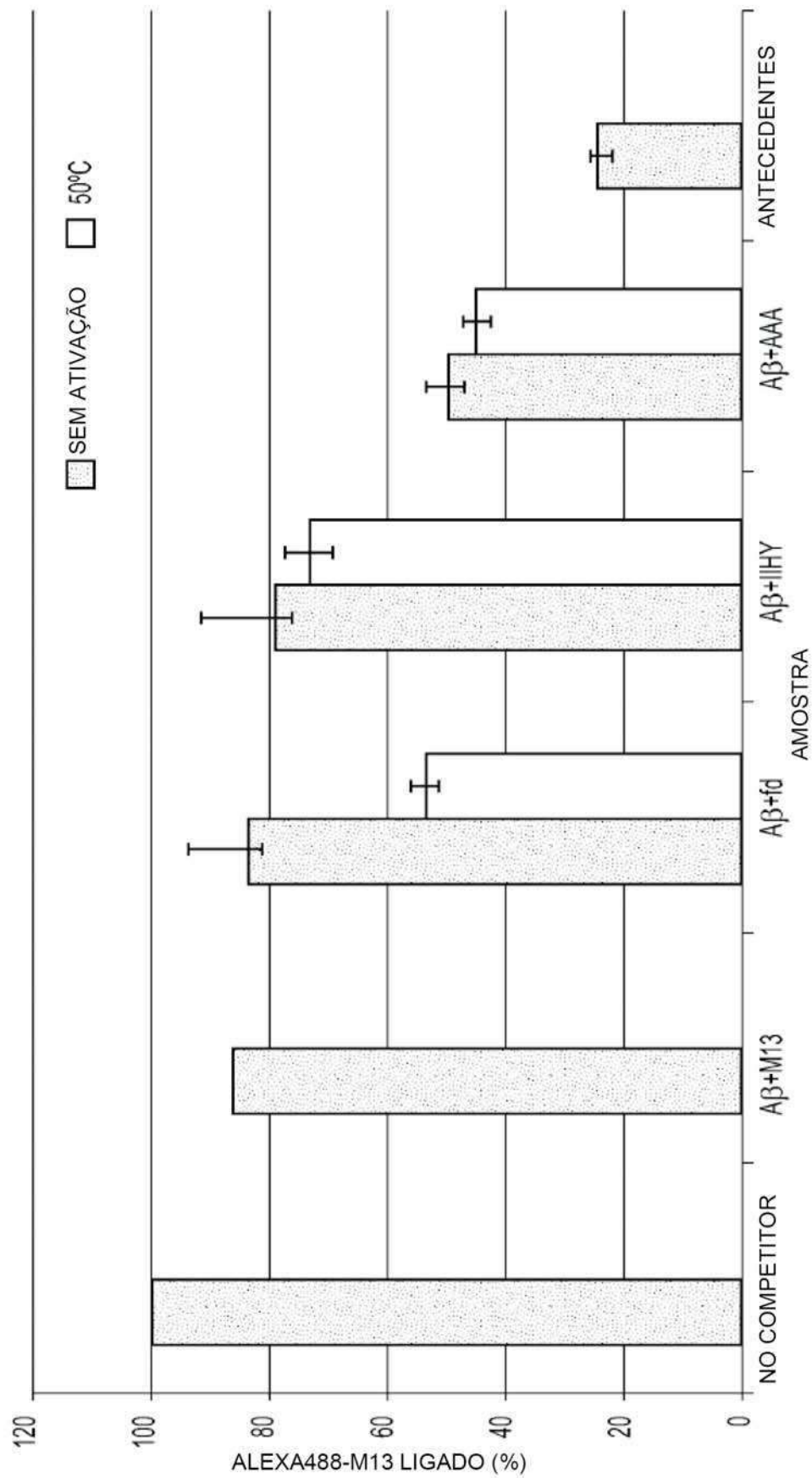
FIG. 7B

**FIG. 8B****FIG. 8A**



**FIG. 10A**

**FIG. 10B**

**FIG. 11**

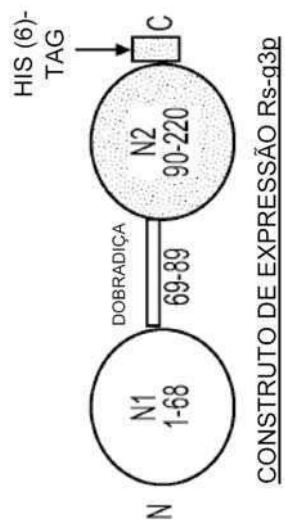


FIG. 12A

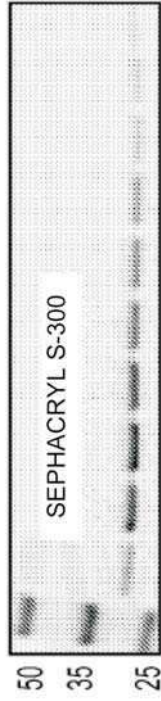


FIG. 12C

TROCA IÔNICA

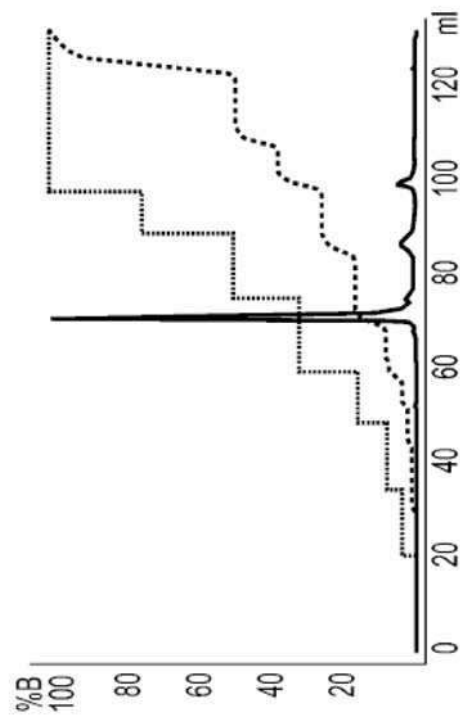


FIG. 12B

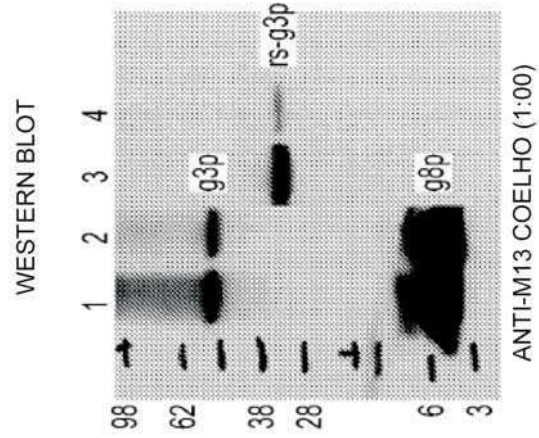
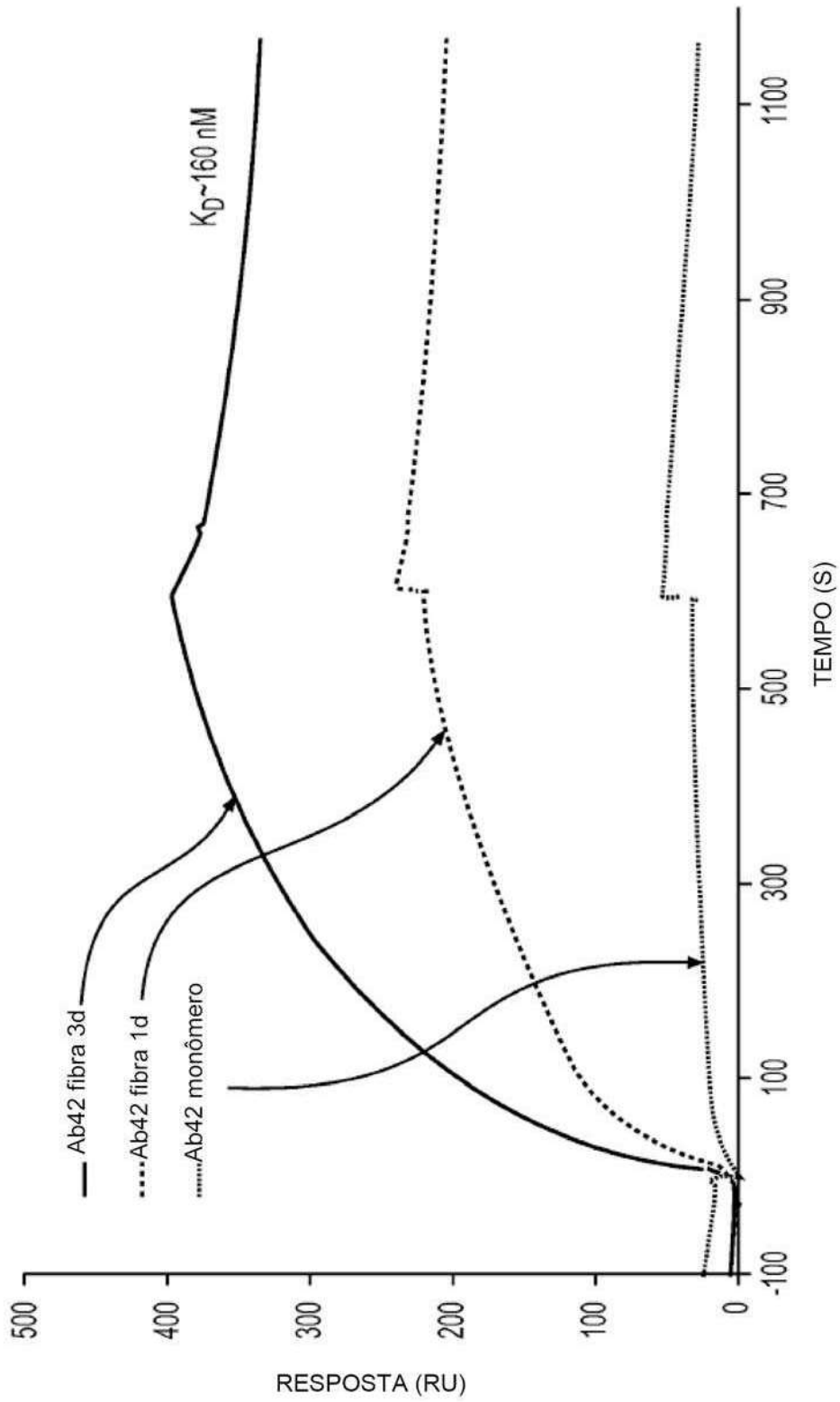


FIG. 12D

**FIG. 13**

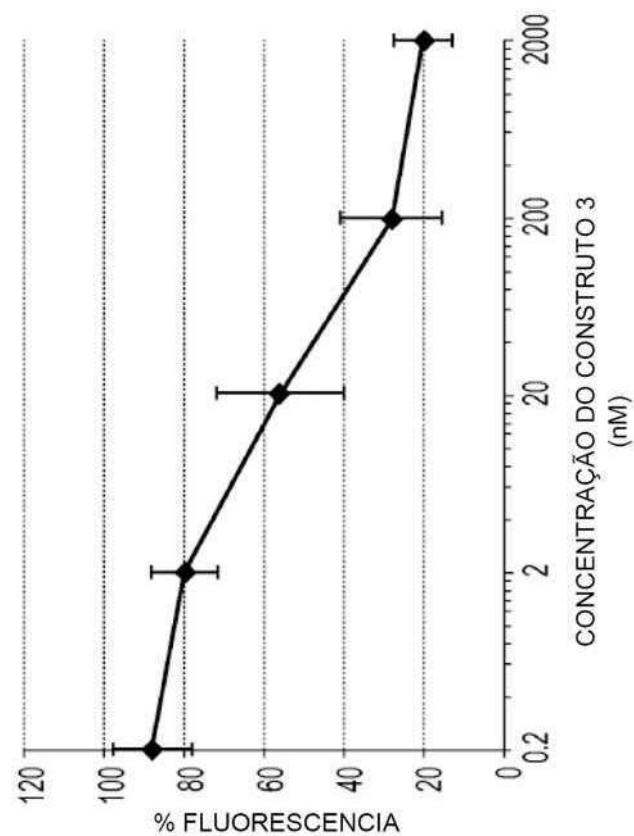


FIG. 14B

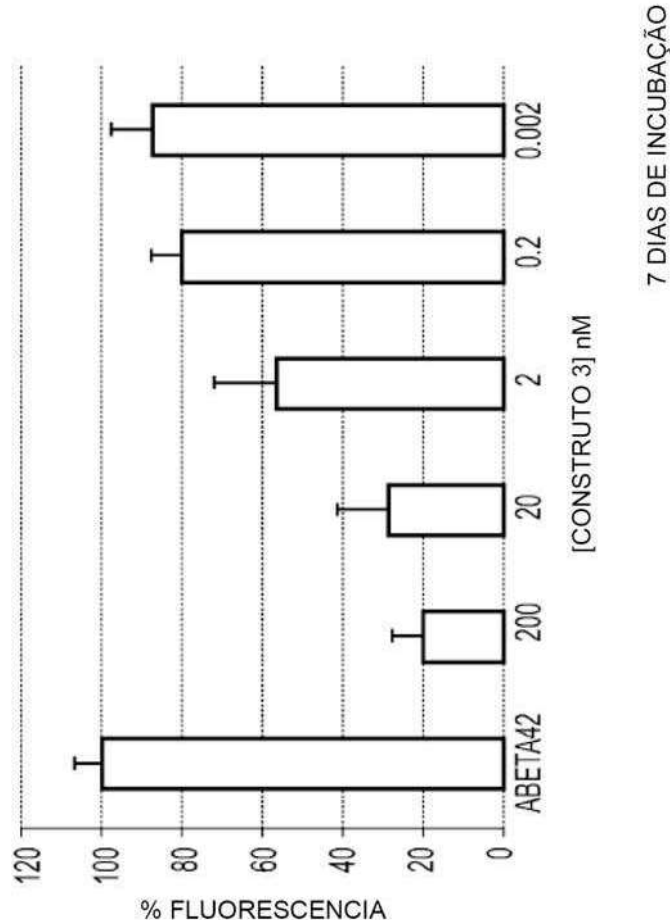
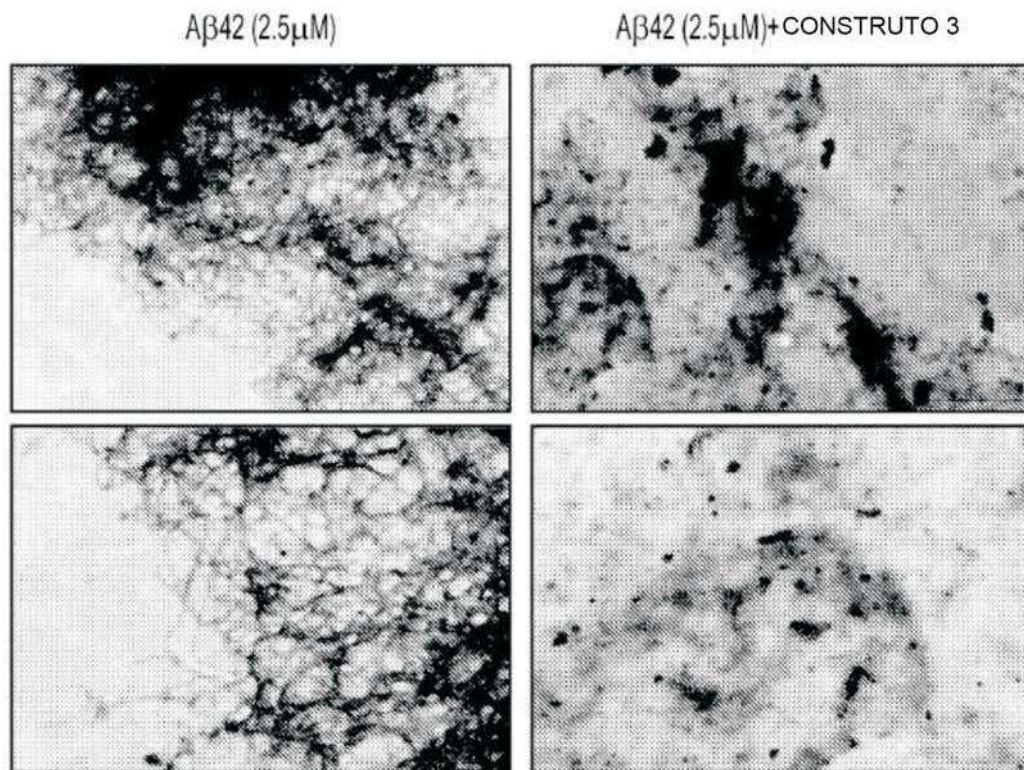
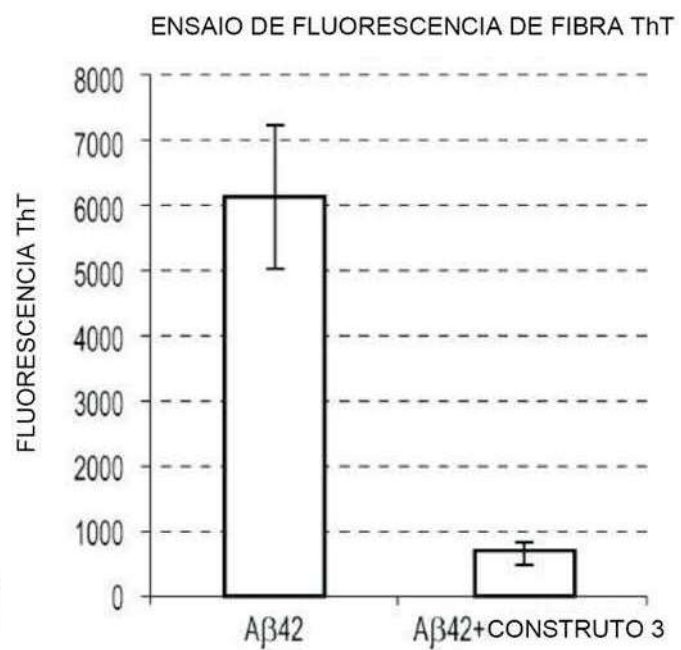
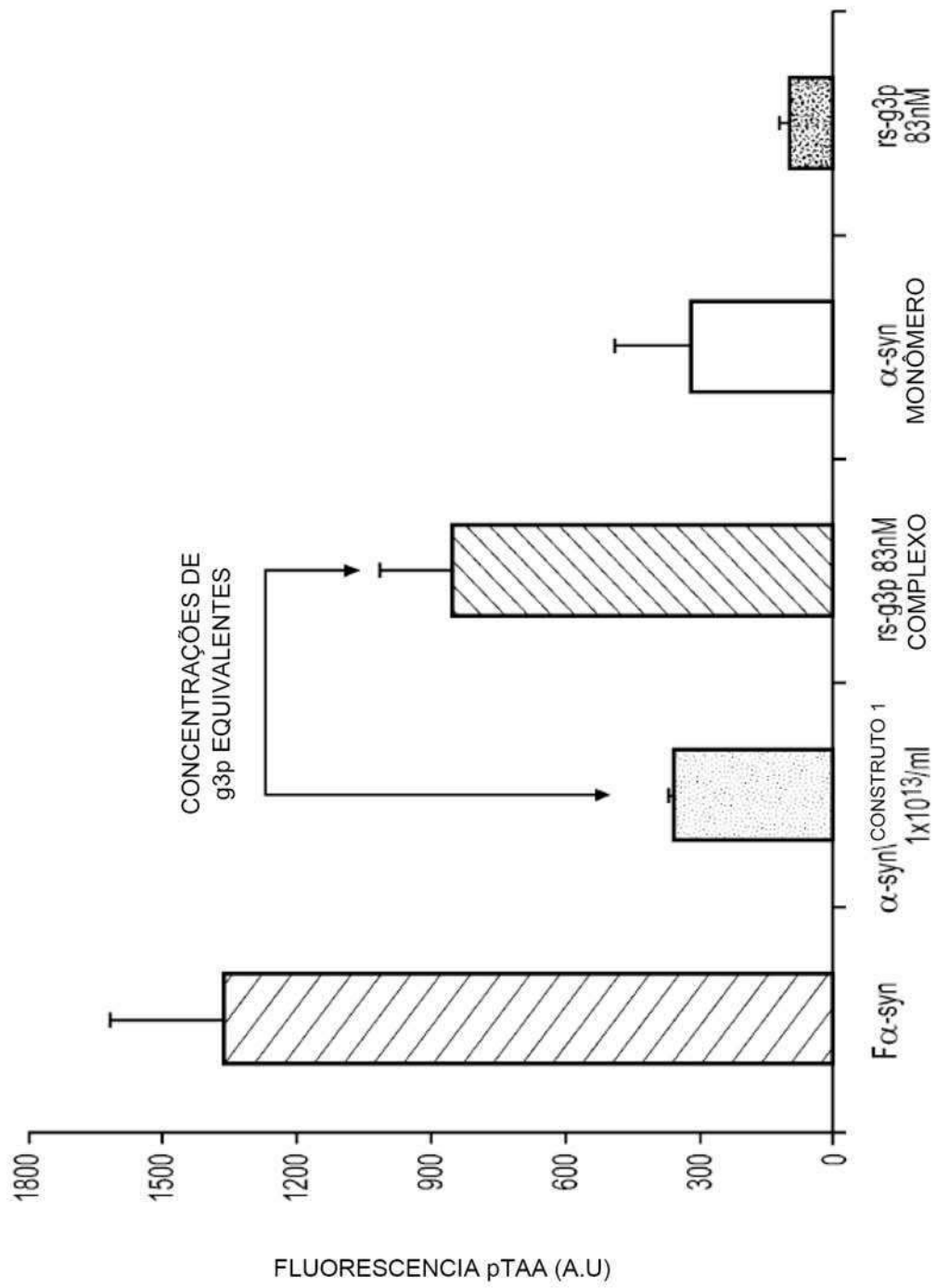


FIG. 14A

**FIG. 15A****FIG. 15B**

**FIG. 16**

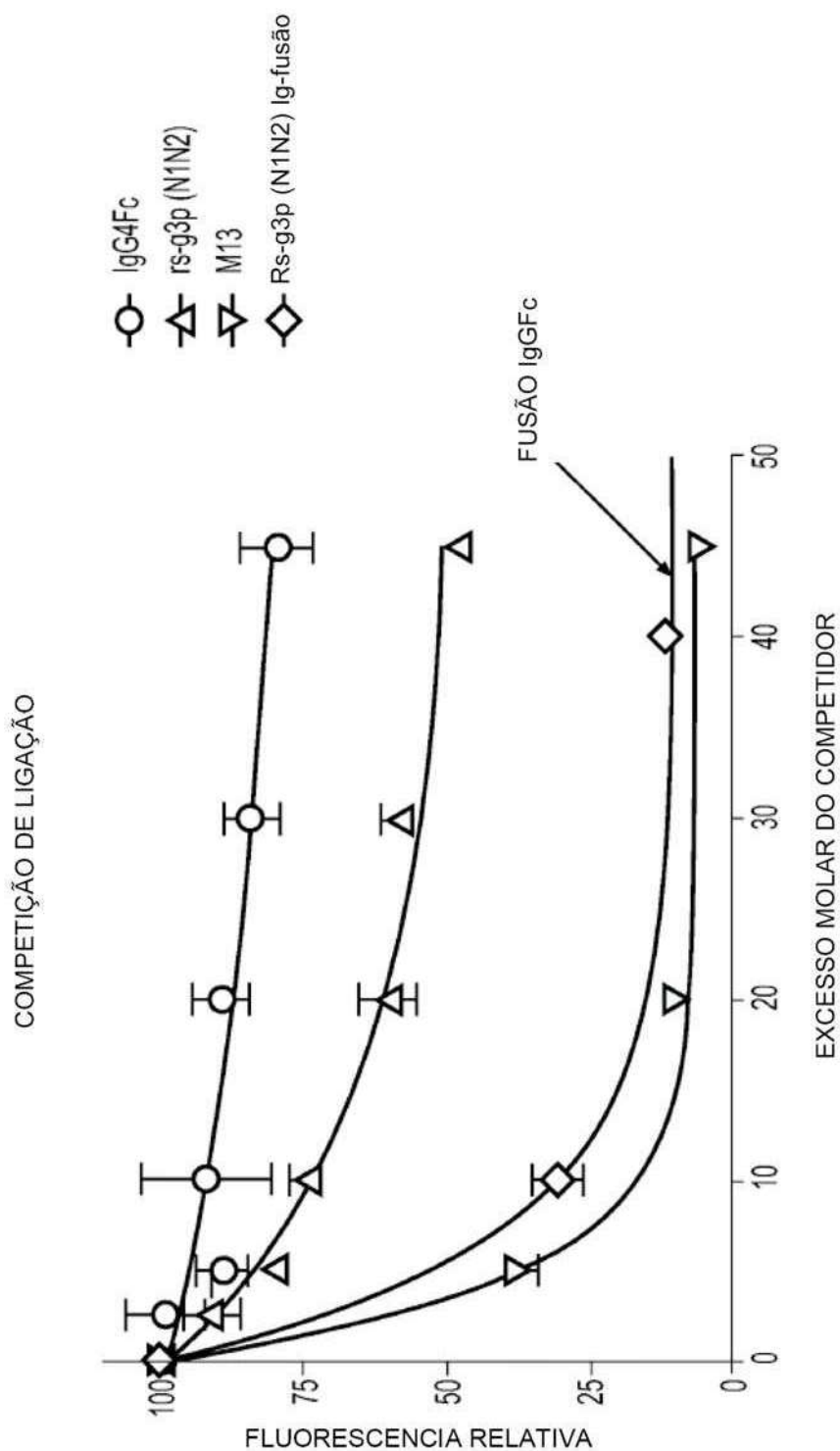


FIG. 17

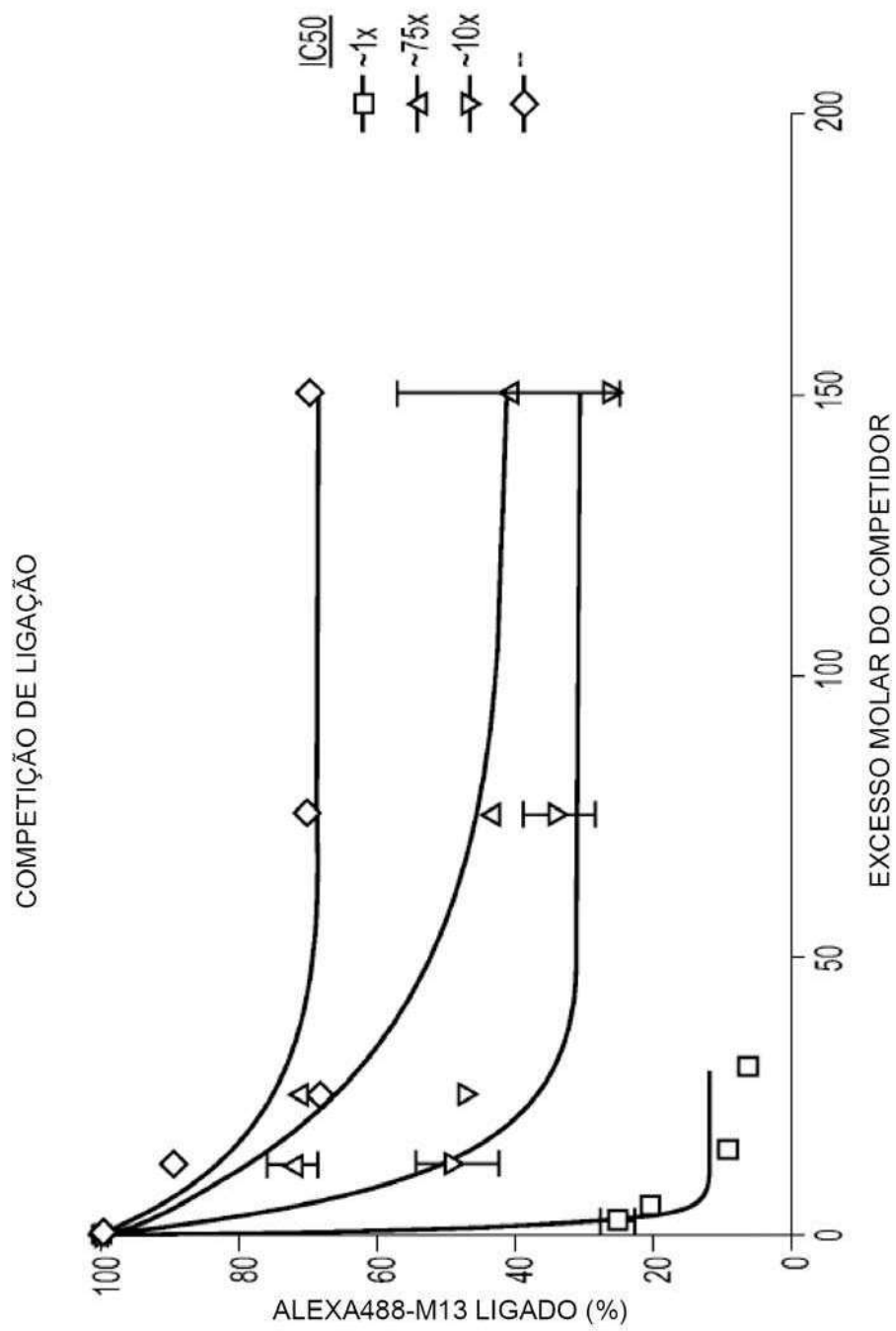


FIG. 18

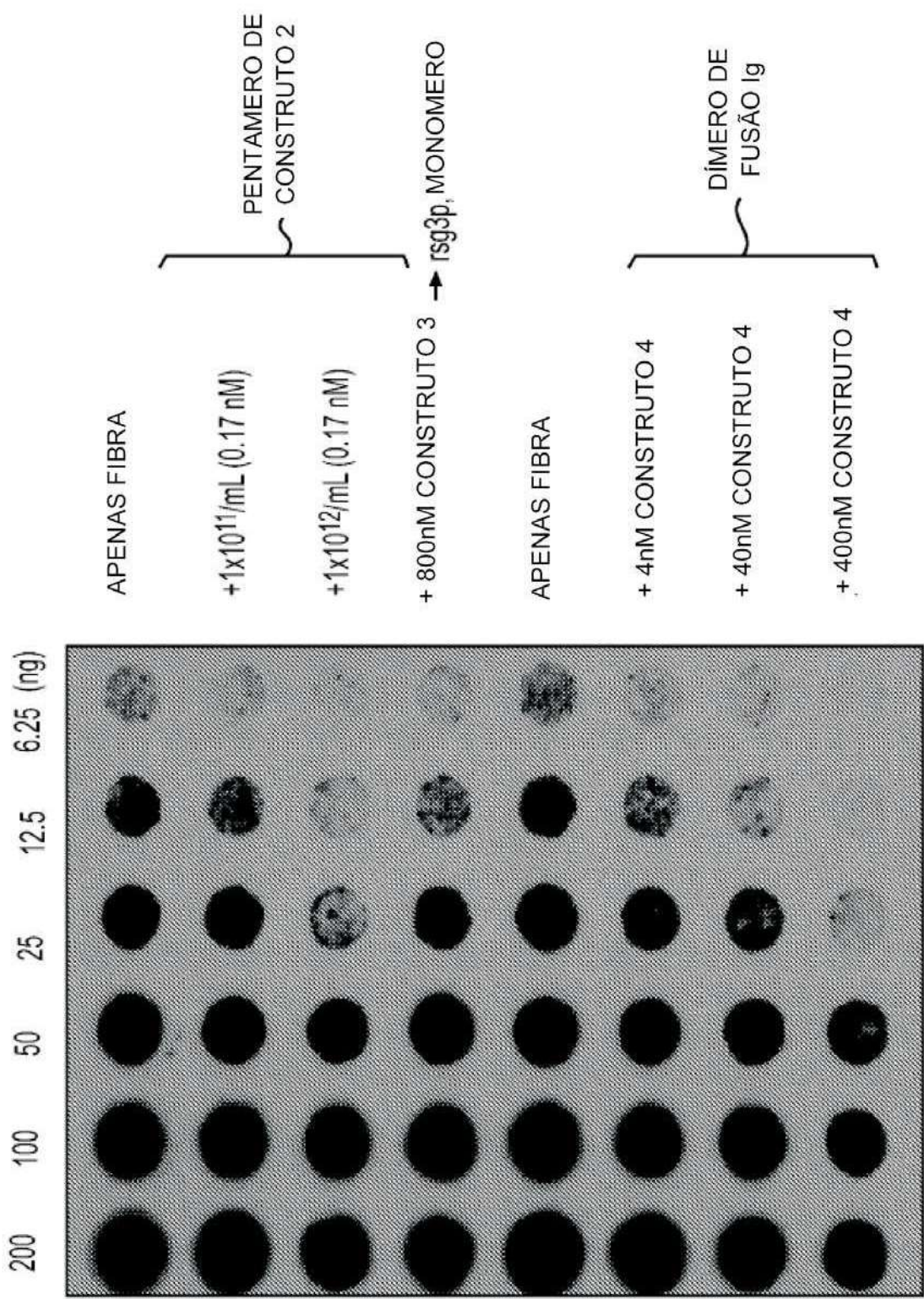


FIG. 19

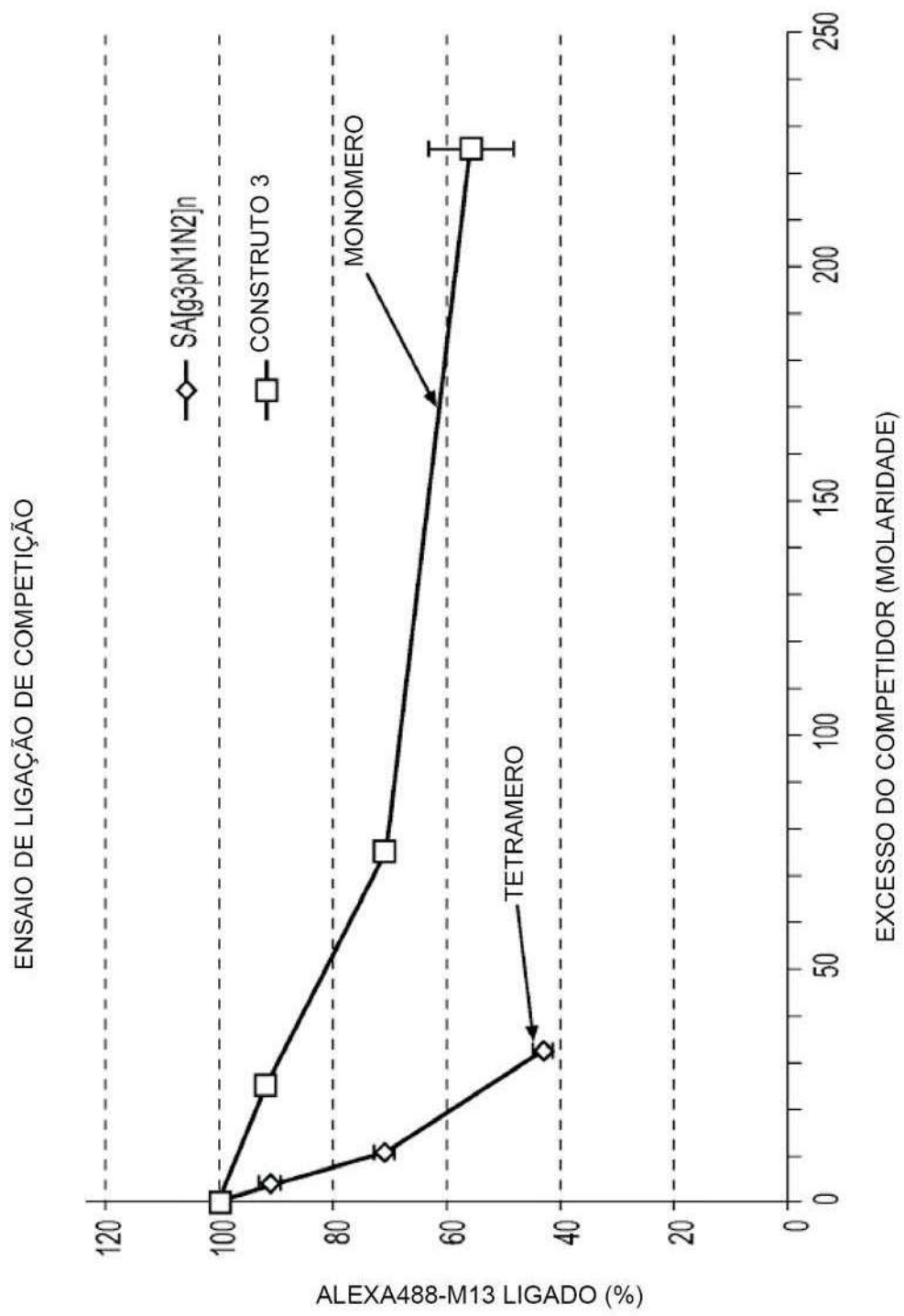
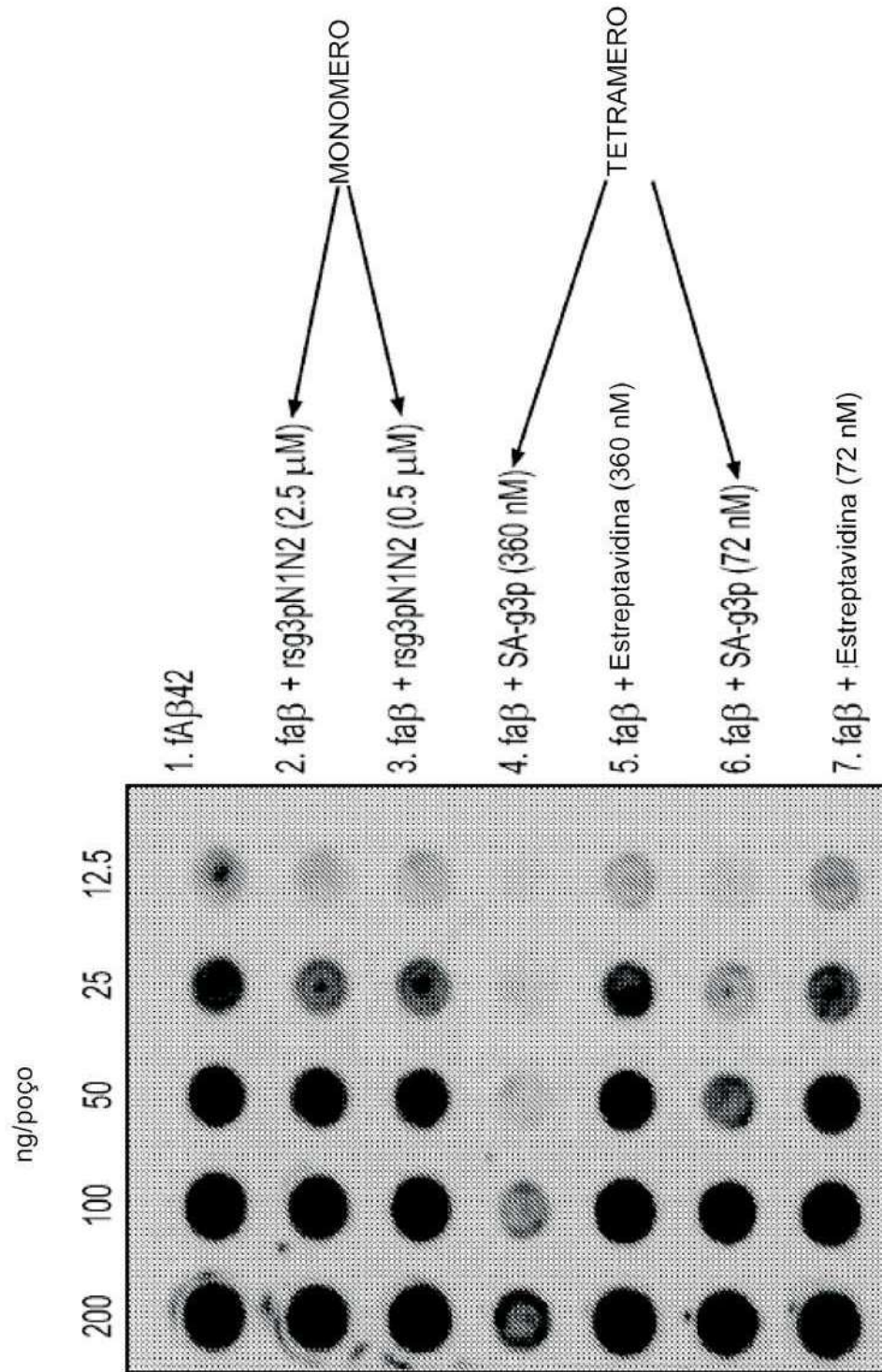
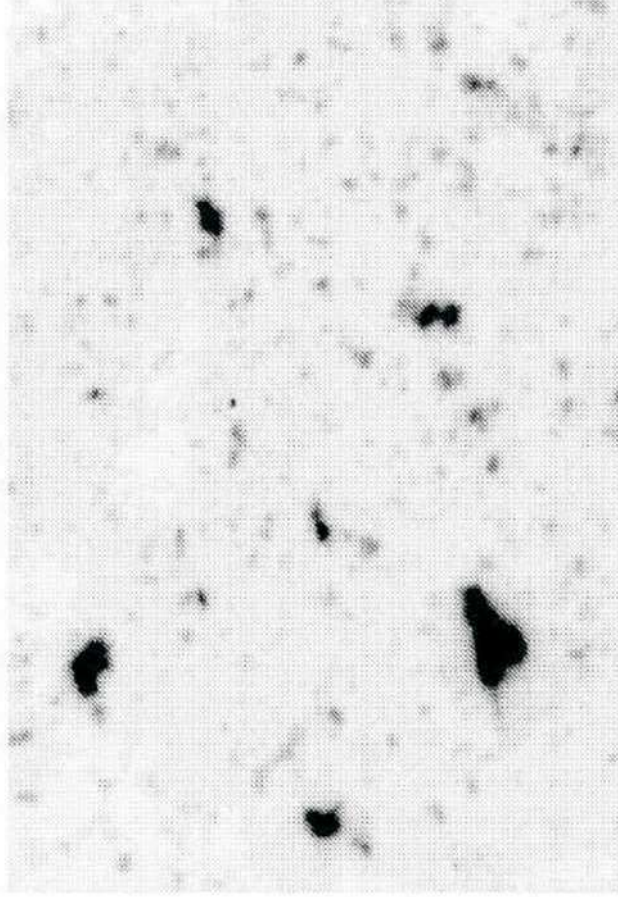


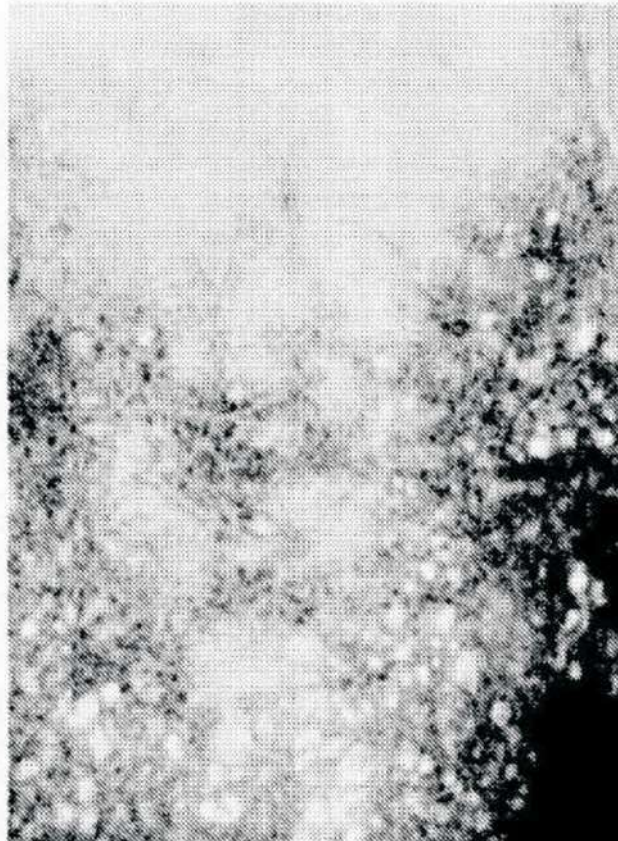
FIG. 20

**FIG. 21**



t= 3 dias

FIG. 22B



t=0

FIG. 22A

N T T P T N G C D R S Y R P
 E E G N G F E S V Y I F S S
 T D G P Q G S P V T T G Y L
 H G G N T S G C V S K K L S
 P T E A V H G P C N E V F L
 K C S P T F E G P T F I L F S
 A V G N G A S S V Q S C S K
 L V G Q T C G R E E S T G Q
 C V G E Y D G V P E P L D T
 S G E T V R G M T R L S S Y
 E T S G T F S A R P G V D H
 V A G P L K G G S K K Q L N
 T N G P A G G S I T N N V H
 E W G Y G N G G M K S K P L
 A L E T Q W A S L A V T P A
 M C S G R Y N G T N K M T E
 S G G D N A V G D H C E T H
 N E G L R D P G K V K E K M
 T Y G P F Y P S P E Y Q Y V
 V N E N R M Q G K V E S N S
 L A N I N A P G P G K P N C
 A Y E Y N K L G P D G P E S
 L R P T Q S D E F V N L P F
 S D I Y F S S S L Y L T Q V
 L L A G M V S G F W W Y G N
 A T L P F P Q G V N D V N G
 I K G I T T G G S F Q Q S E
 C D I P N Y Q E P Q H P E Q
 S D P T L Q Y S G V L E W W
 L K V D P Y E G G E V R E R
 L W W G Q Y C G L P T P V S
 Q V T Y S T V G F D L Q A K
 M N G E E K F E E E V G I D
 R T Y P E V P S P Q S K D V
 Y F C P L P D G A S V A S T K
 M S Q K S D E G P V V K P L G

(SEQ ID NO:9)

FIG. 23

Q ID NO:11)

FIG. 25

fd	TKPEYGDTPIPGYIINPLDGYPPGTEQN PAN
f1	TKPEYGDTPIPGYIINPLDGYPPGTEQN PAN
M13	TKPEYGDTPIPGYIINPLDGYPPGTEQN PAN
Ike	S-PGEKTESWIRAQVEGDIQRSVPD--EEPSEQ
I2-2	S-PSEKTESWIRAQVEGDMQRSVPD--EEPSEQ
If1	STPDTVTPGQTVNLP SDSLSTL SIPANVVKDSIG
	; *
fd	PNPSLEE-----SQPLNTFMFQNNFRNRQGALT VYTGTVTQGTDPVKTY
f1	PNPSLEE-----SQPLNTFMFQNNFRNRQGALT VYTGTVTQGTDPVKTY
M13	PNPSLEE-----SQPLNTFMFQNNFRNRQGALT VYTGTVTQGTDPVKTY
Ike	TPEEICE-----AKPPIDGVFN NVFKGDEGGFY INYNGCEYEATGVTVCQ
I2-2	TPEEICE-----AKPPIDGVFN NVSKGDEGGFY INYNGCEYEATGVTVCQ
If1	SQFSLYT NASCTMCSGYLSNNADSI ANITETVKADYNQPD MWFEQTDSDGNHVKILQ

fd	YQYTPVSS-----KAMYDAYWNGKFRDCAFHSG-----FNEDPFVCEYQGQSSDL
f1	YQYTPVSS-----KAMYDAYWNGKFRDCAFHSG-----FNEDPFVCEYQGQSSDL
M13	YQYTPVSS-----KAMYDAYWNGKFRDCAFHSG-----FNEDPFVCEYQGQSSDL
Ike	NDGTVCSS-----SAWKPTGYVPESGEPSSSPL-----KDGD TGGTGEGGSDTGG
I2-2	NDGTVCAS-----SAWKPTGYVPESGESSSSPV-----KDGD TGGTGEGGSDTGG
If1	NSYKAVSYNVESKQSDVNNPTI INYSYSVNVKQVSYDTSNVCIMNWETFQNKCDASRAVL

fd	PQPPVNA (SEQ ID NO:14)
f1	PQPPVNA (SEQ ID NO:15)
M13	PQPPVNA (SEQ ID NO:16)
Ike	DTGGGDT (SEQ ID NO:17)
I2-2	DTGGGDT (SEQ ID NO:18)
If1	ITDTVTP (SEQ ID NO:19)

FIG. 26

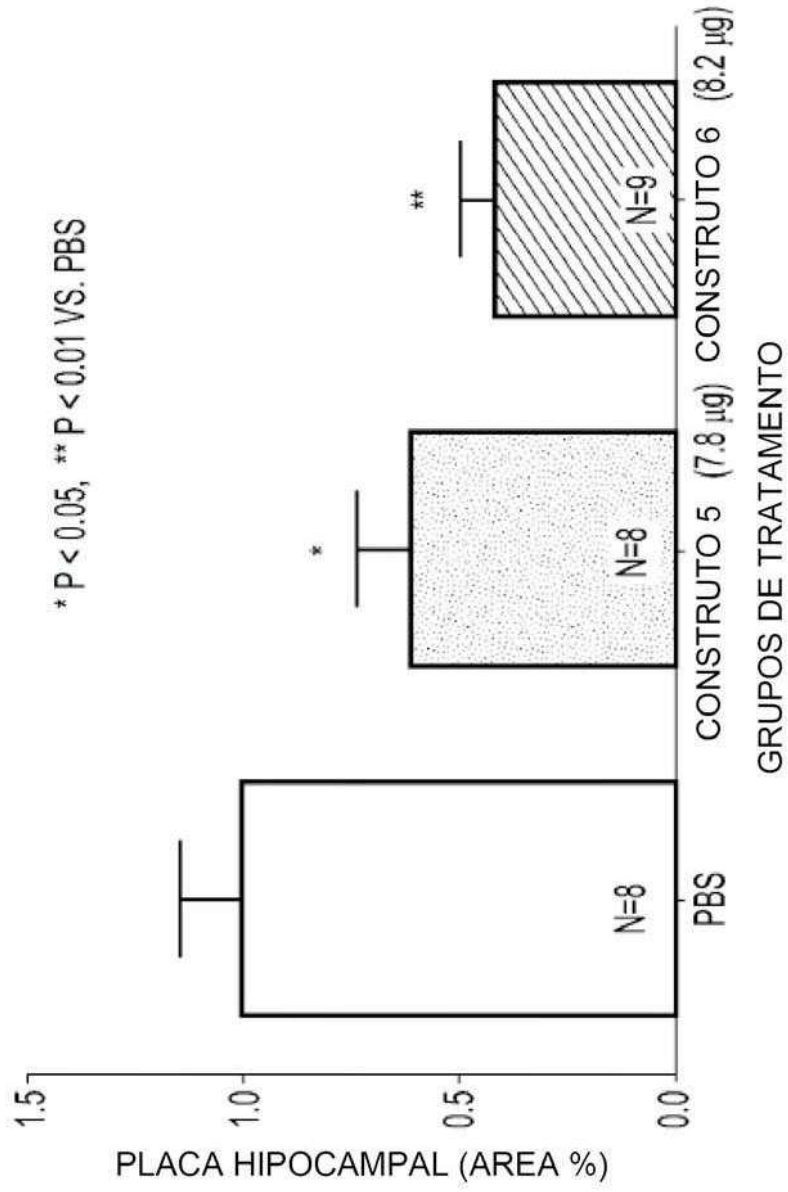


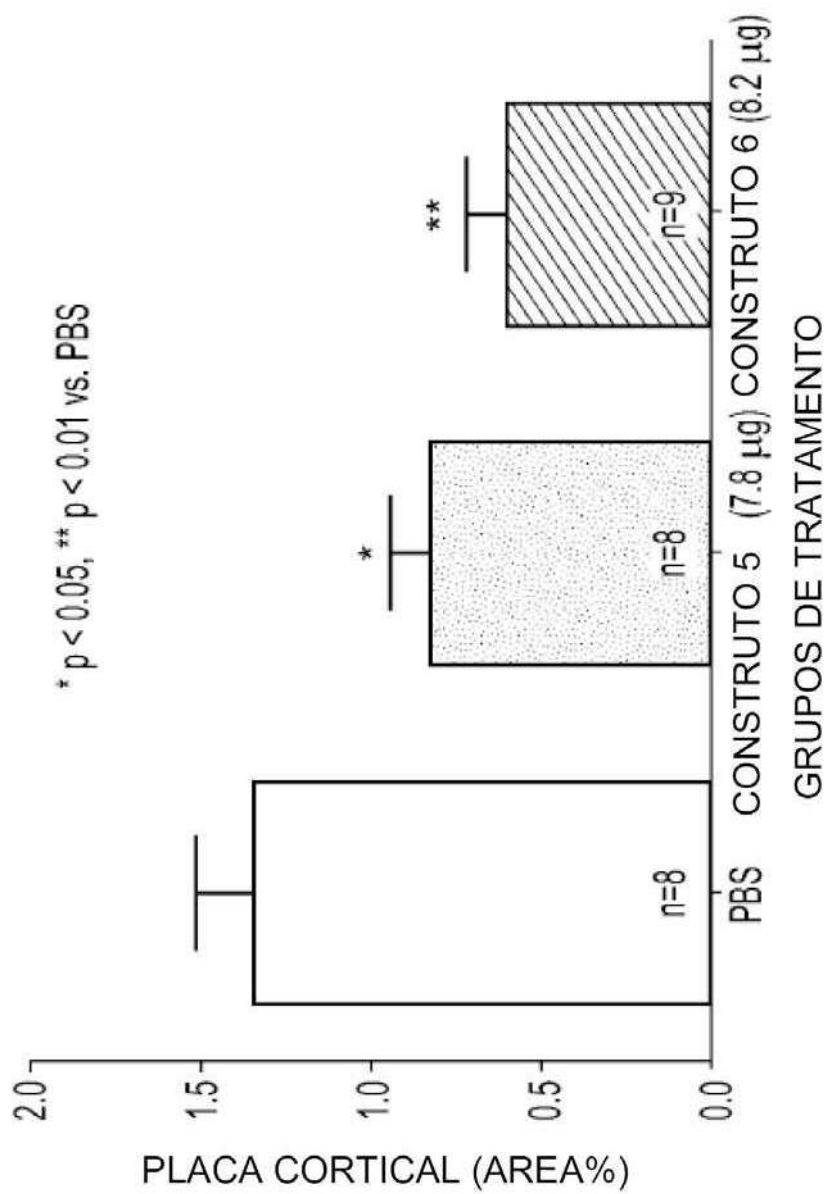
FIG. 27B

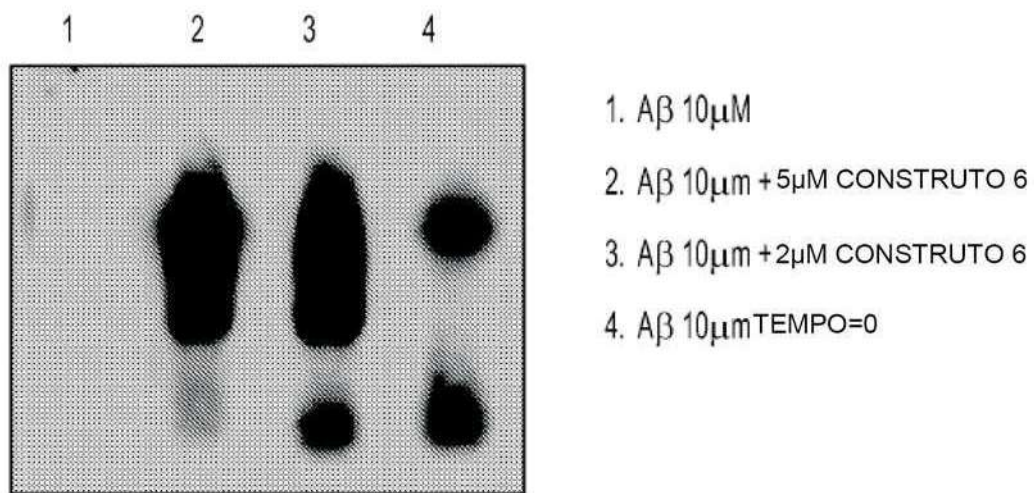
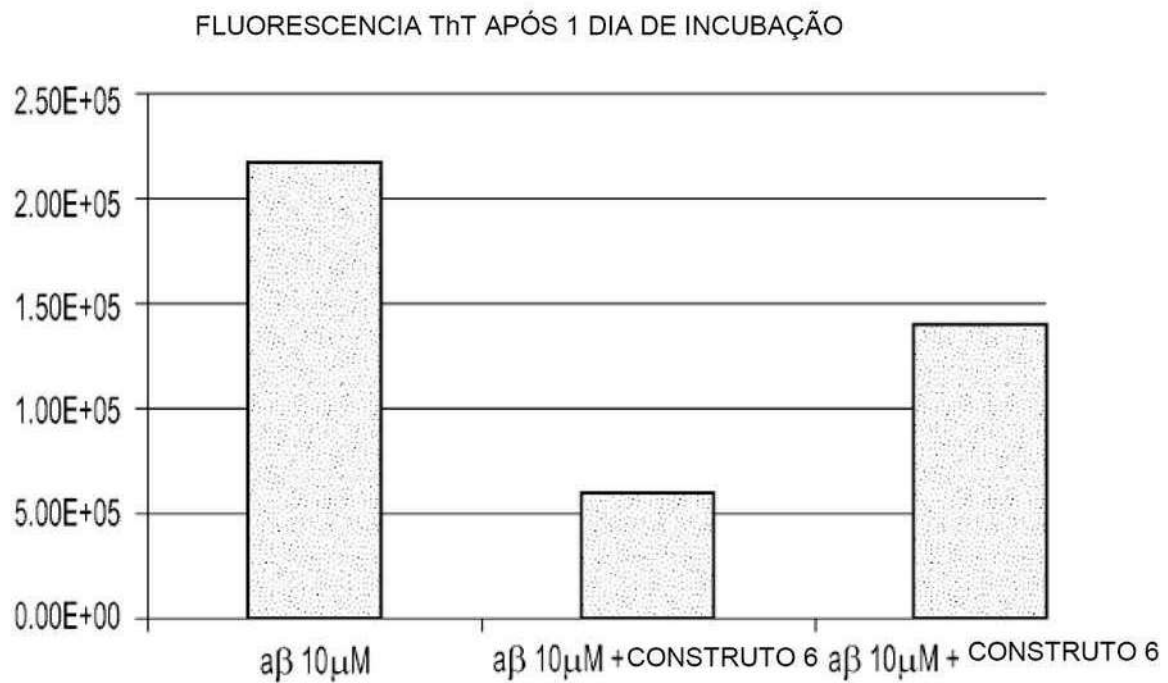
E G N N K D
 Y E I N S S
 N N Y Q S S
 A E T F V Q
 Y P Y M P G
 R I G F T Q
 D A P T Y Y
 L L I N Q E
 T G P L Y C
 K I T P Y V
 D P D Q T F
 D V G S K L
 K W Y E V D
 W T E E P E
 V G P L D N
 N Y P S T F
 T C K P G G
 F Q T N Q S
 S T G P T H H
 N E G N V F H H
 E D G A T A H H
 T G E P G C H H
 H T S N T D H H
 S C G Q Y R H H
 K V G E V F G G
 A V G T T K S S
 L V E G L G P P
 C G S P A N A A
 S T G P G W N N
 E A G Y Q Y V V
 V N G T R A P P
 T W E G N D P P
 E L S D R Y Q Q
 A C G L F M P P

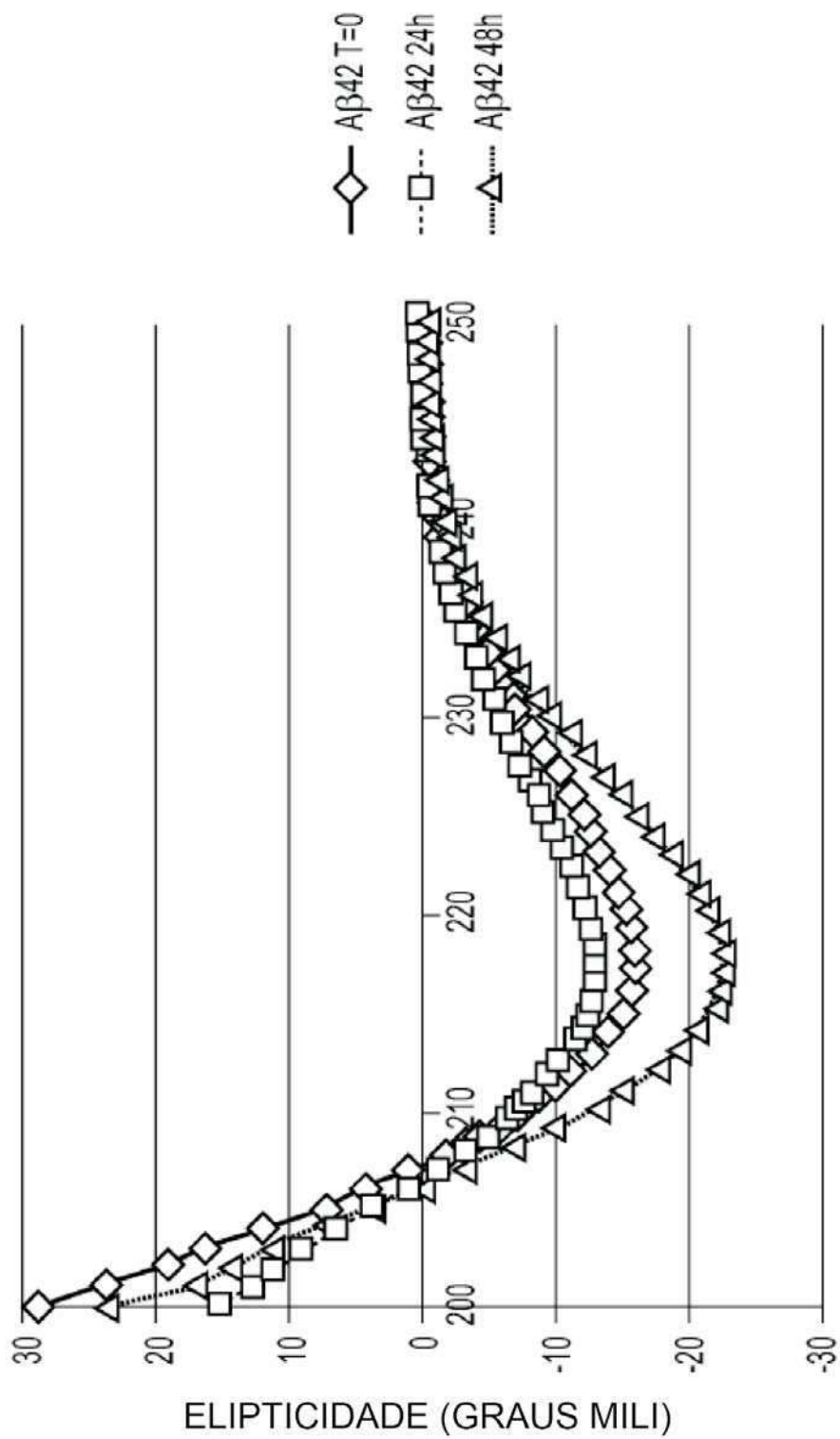
(SEQ ID NO:24)

FIG. 27C

**FIG. 28**

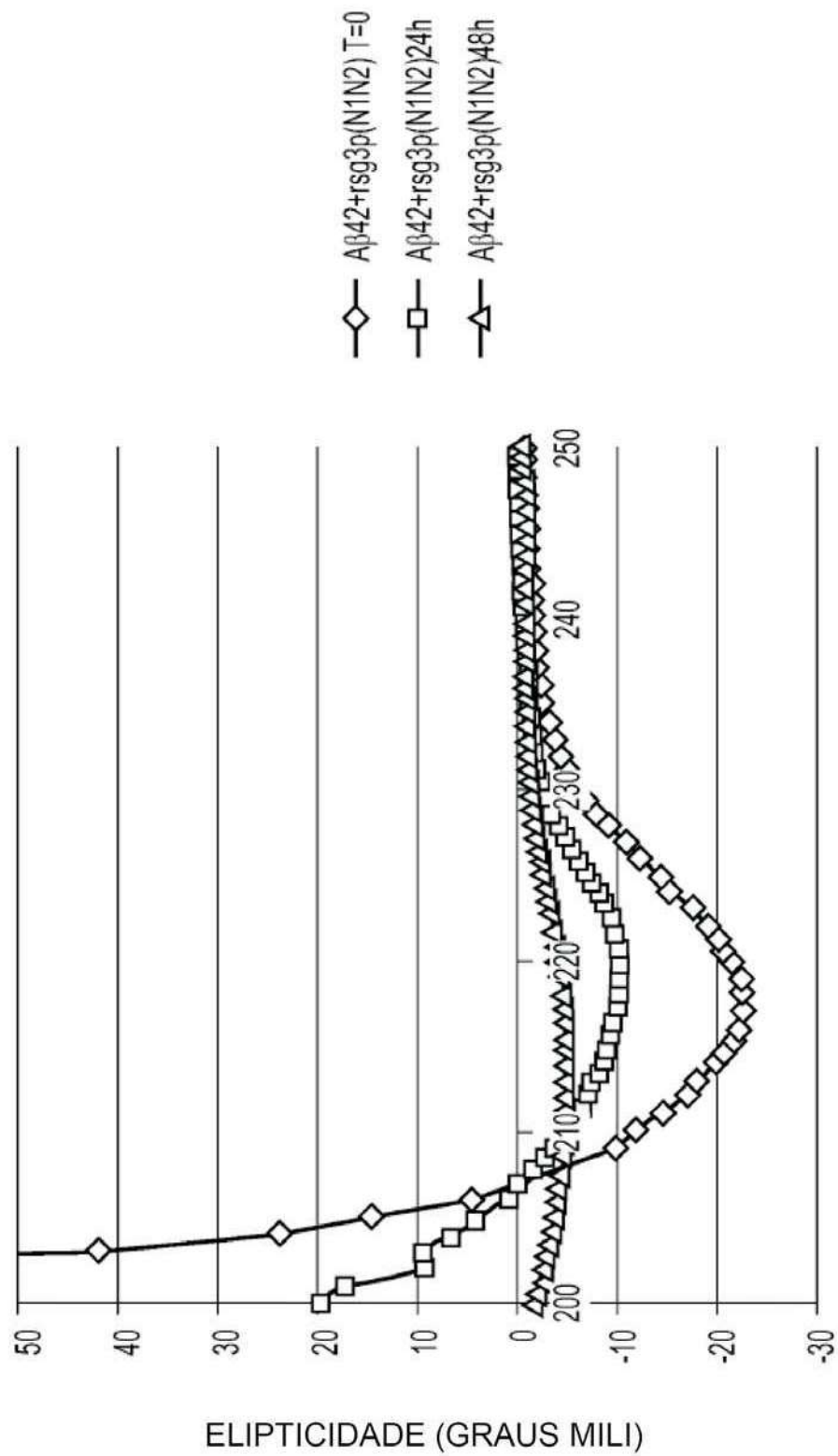
**FIG. 29**

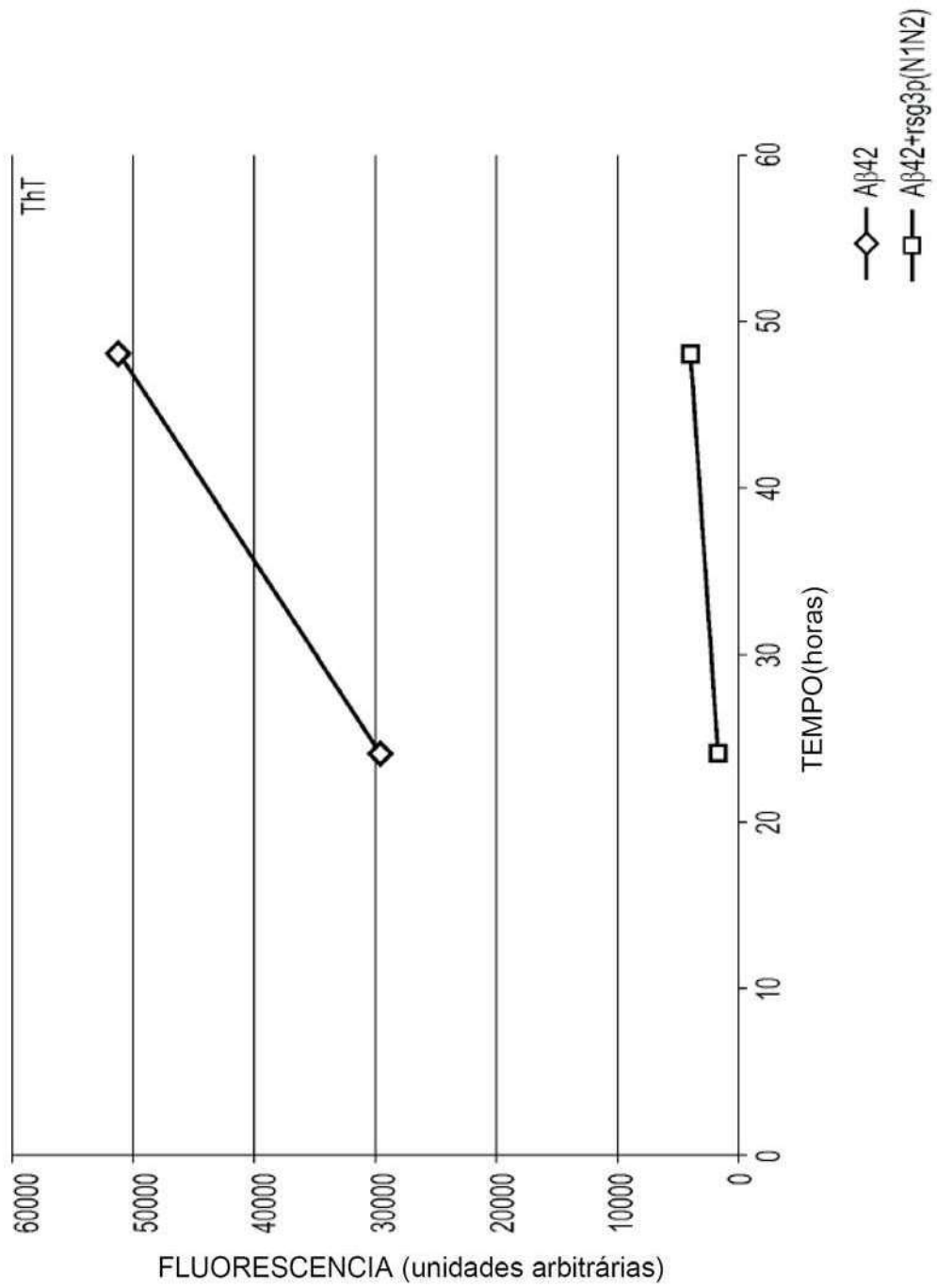
**FIG. 30A****FIG. 30B**

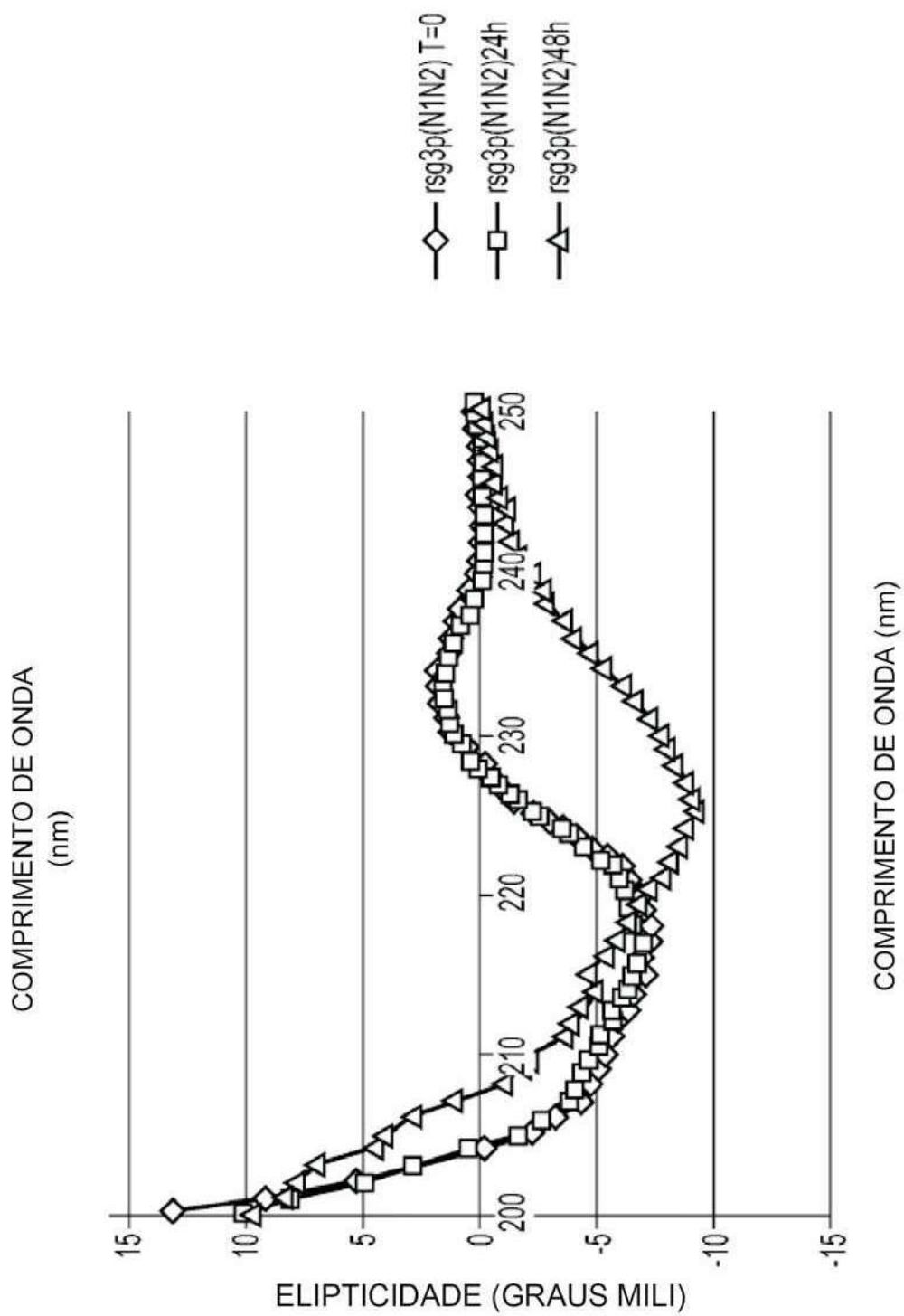


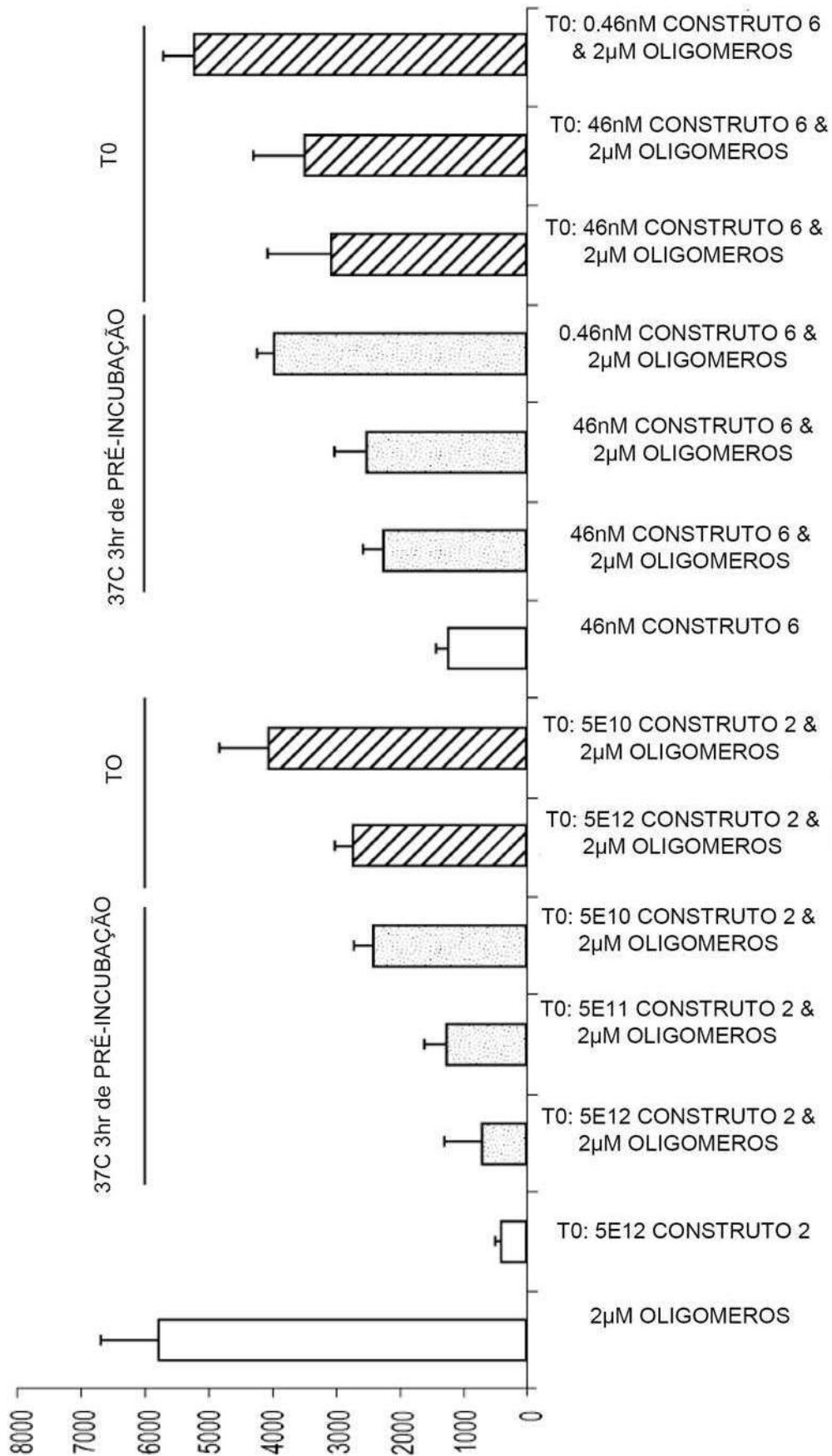
COMPRIMENTO DE ONDE (nm)

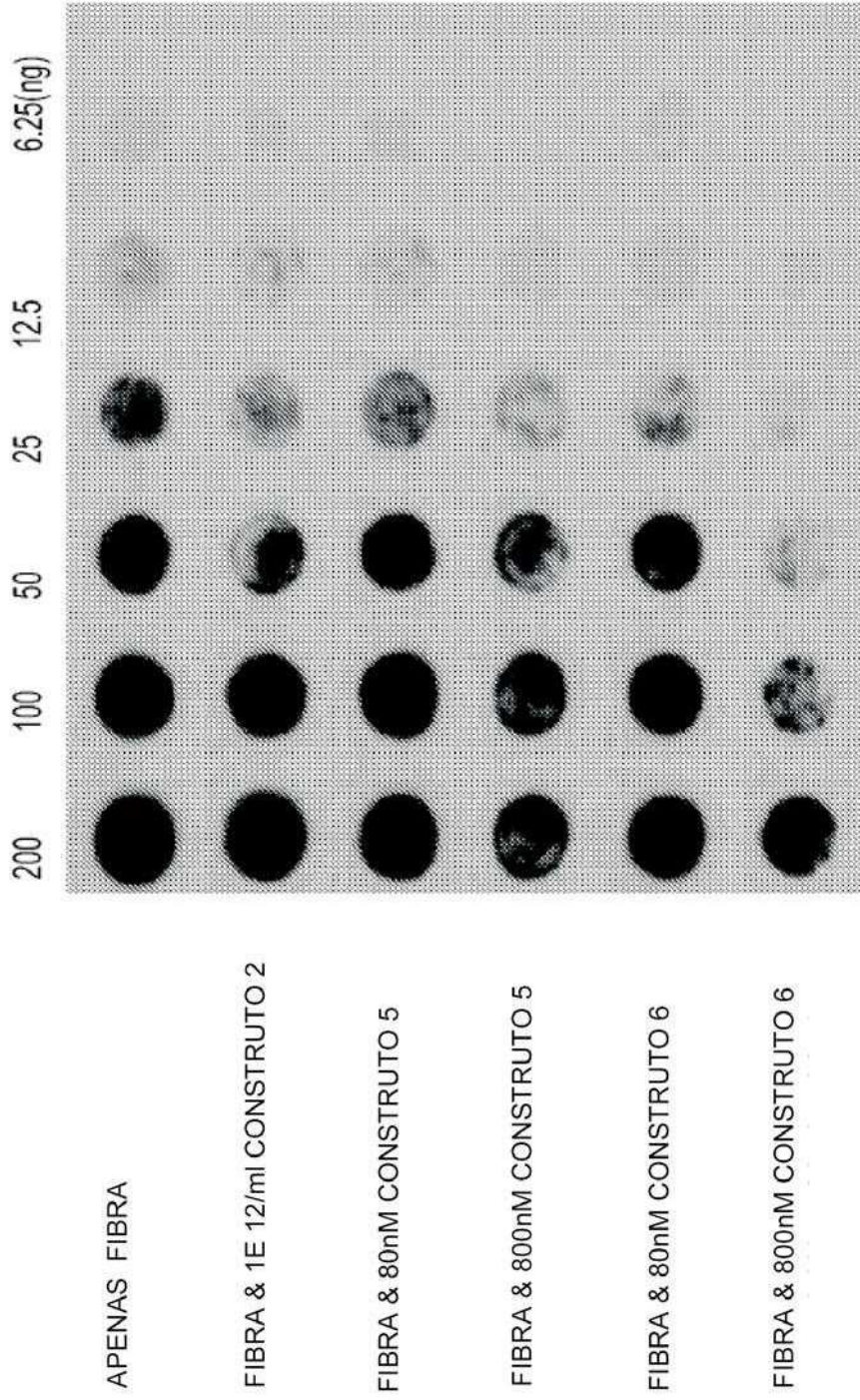
FIG. 31A

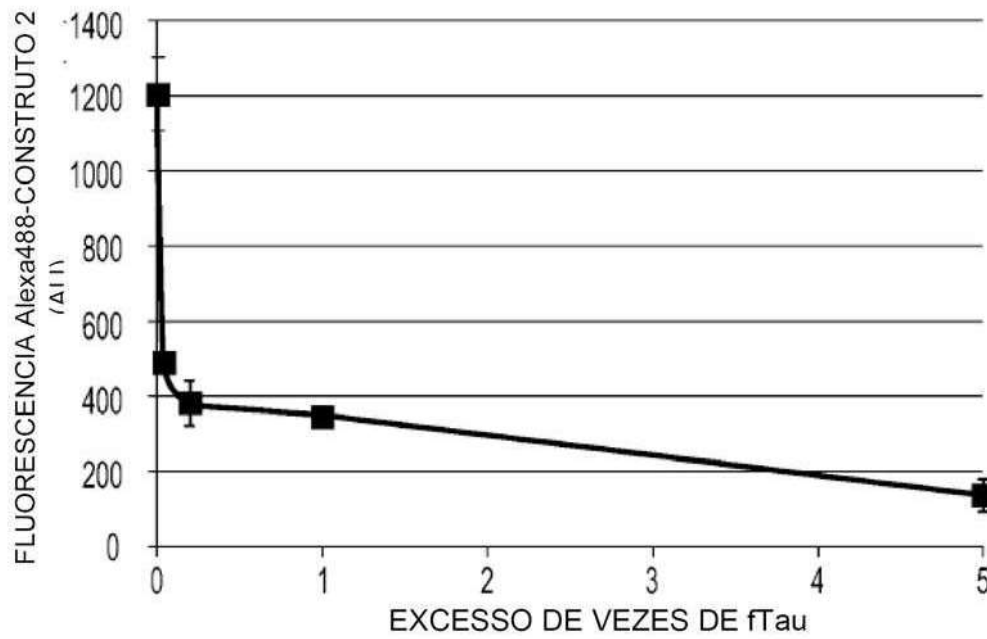
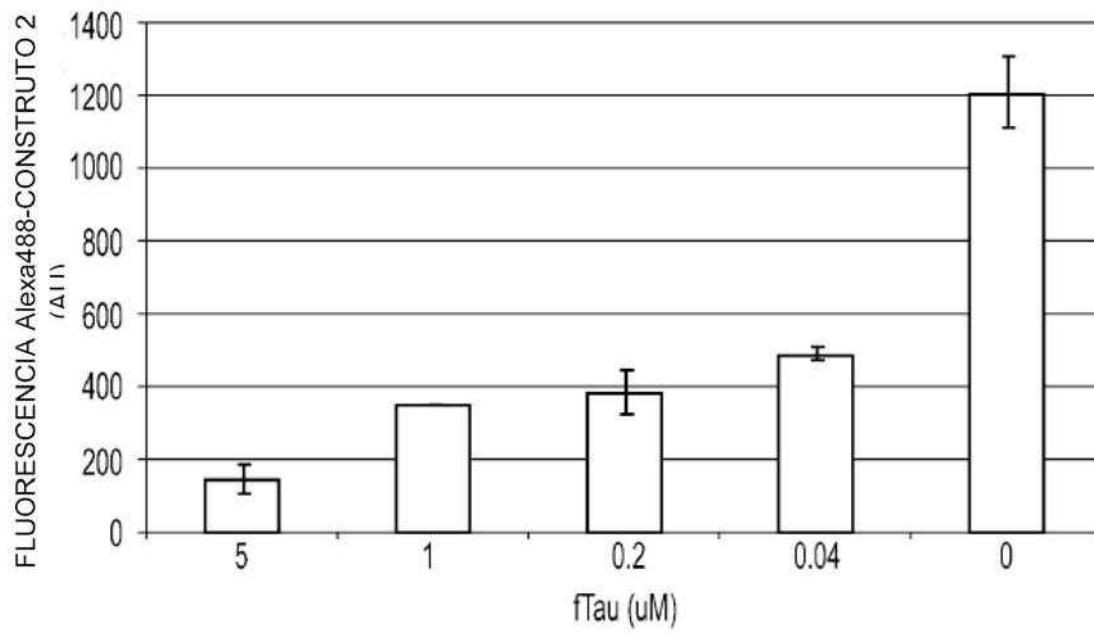
**FIG. 31B**

**FIG. 31C**

**FIG. 31D**

**FIG. 32**

**FIG. 33**

**FIG. 34A****FIG. 34B**

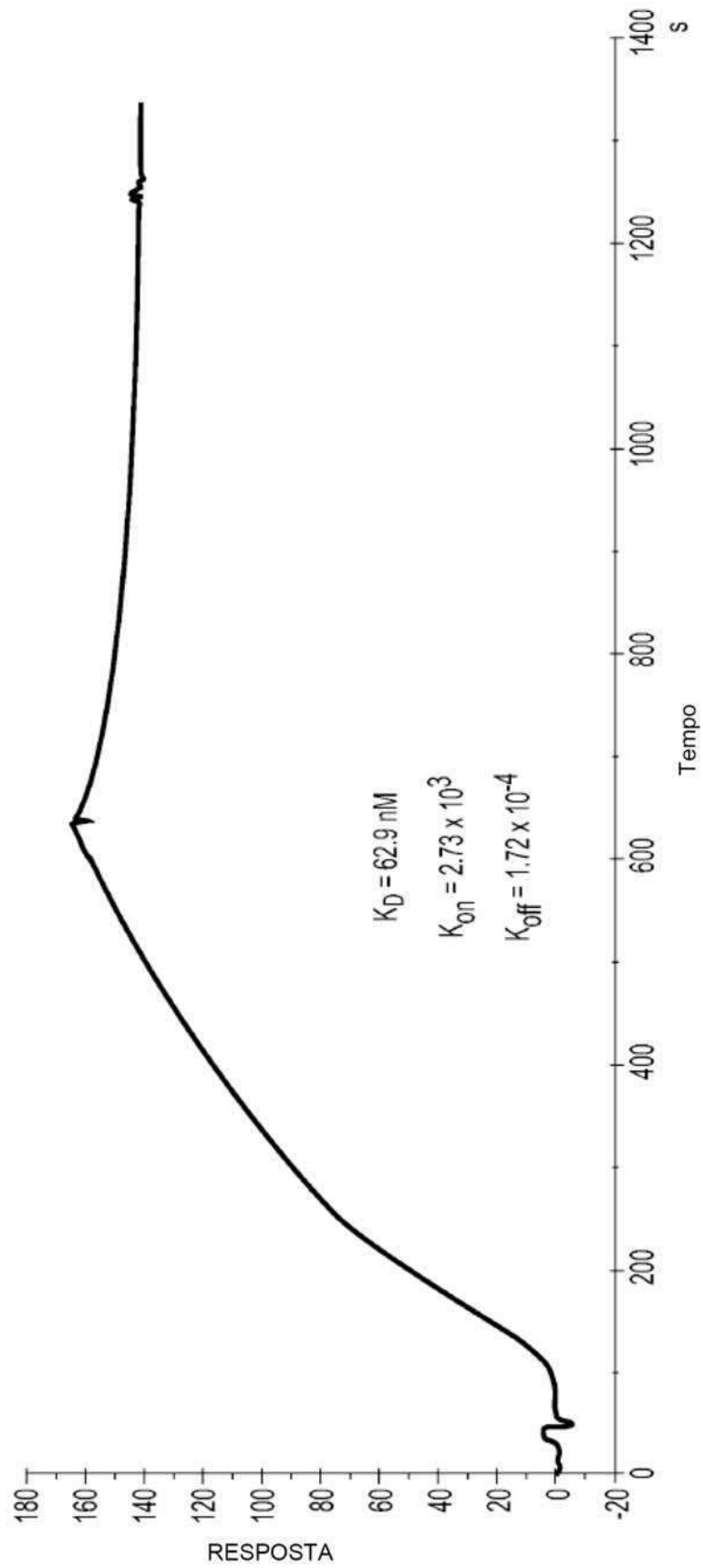
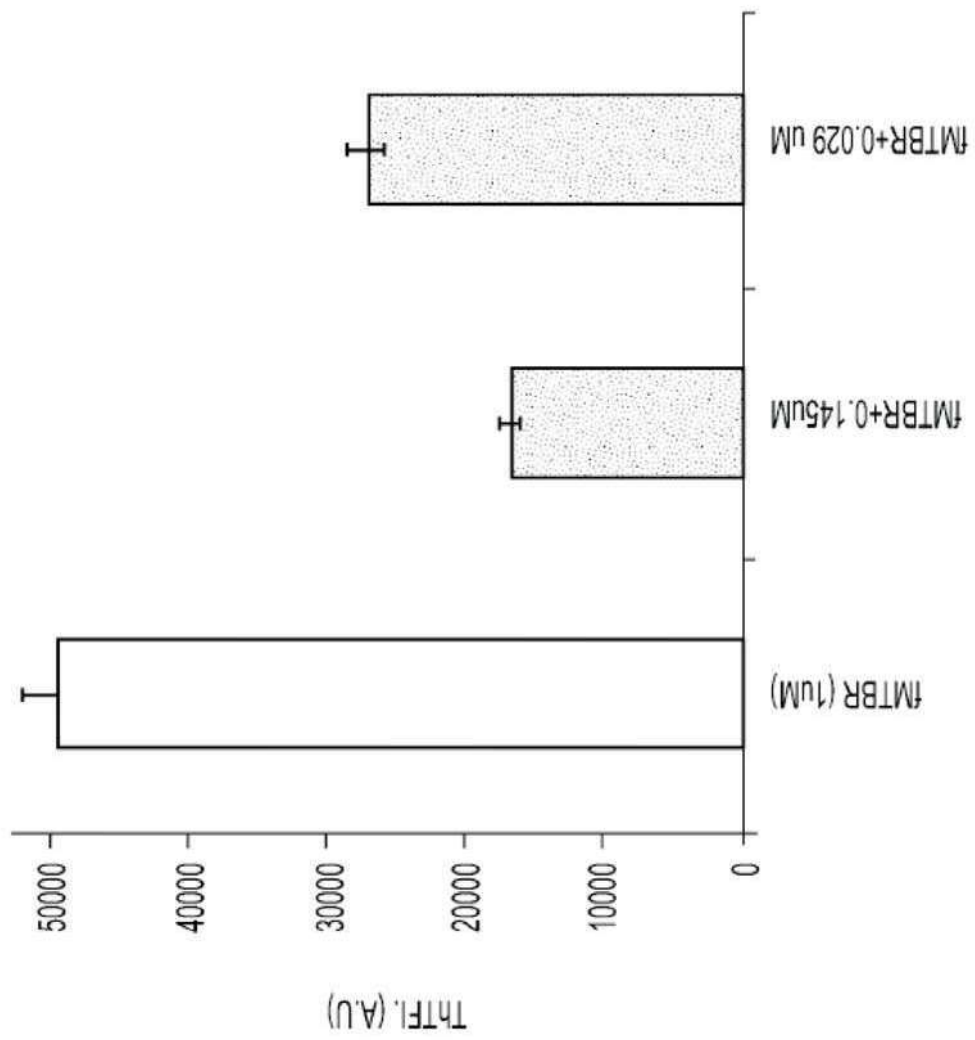
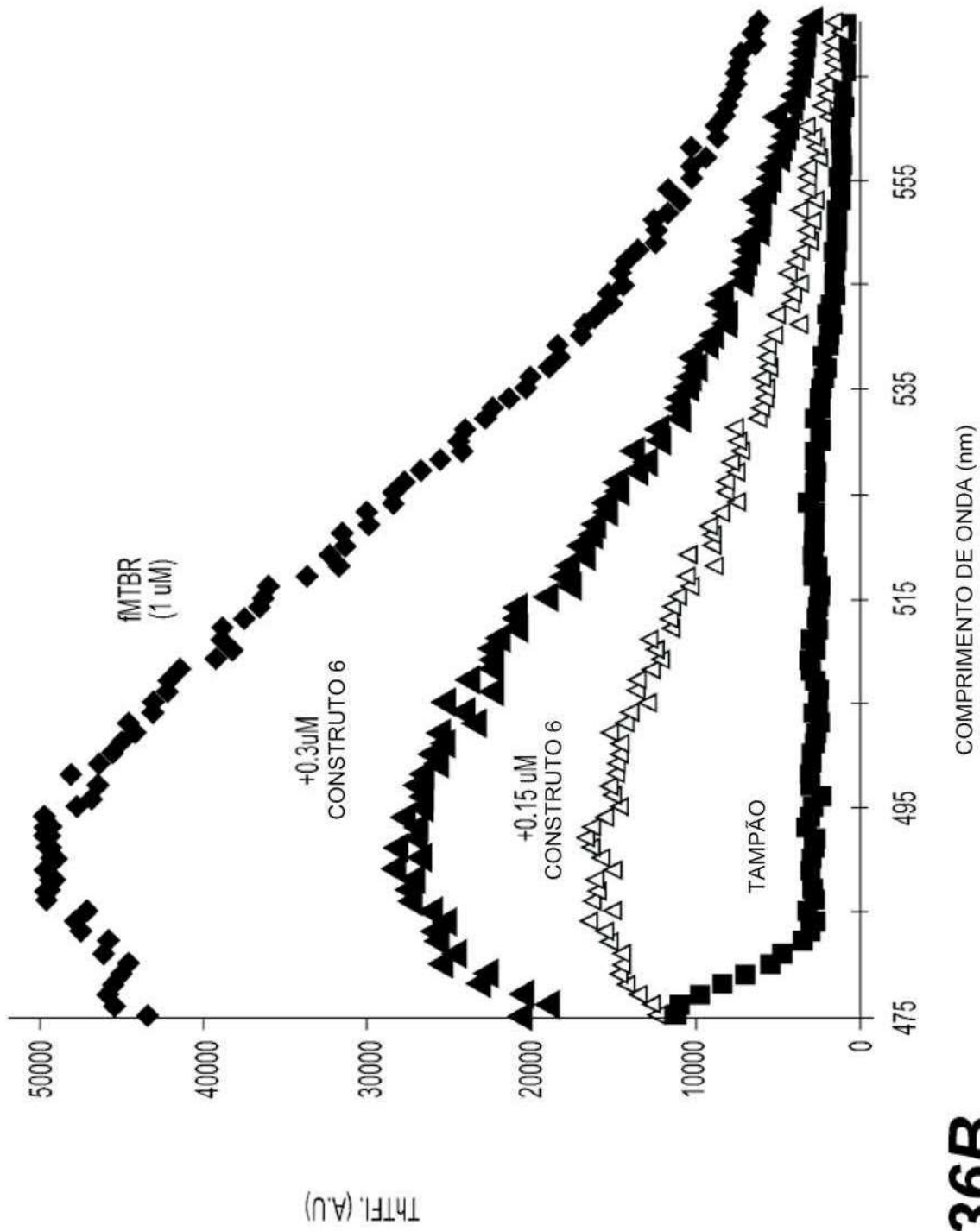
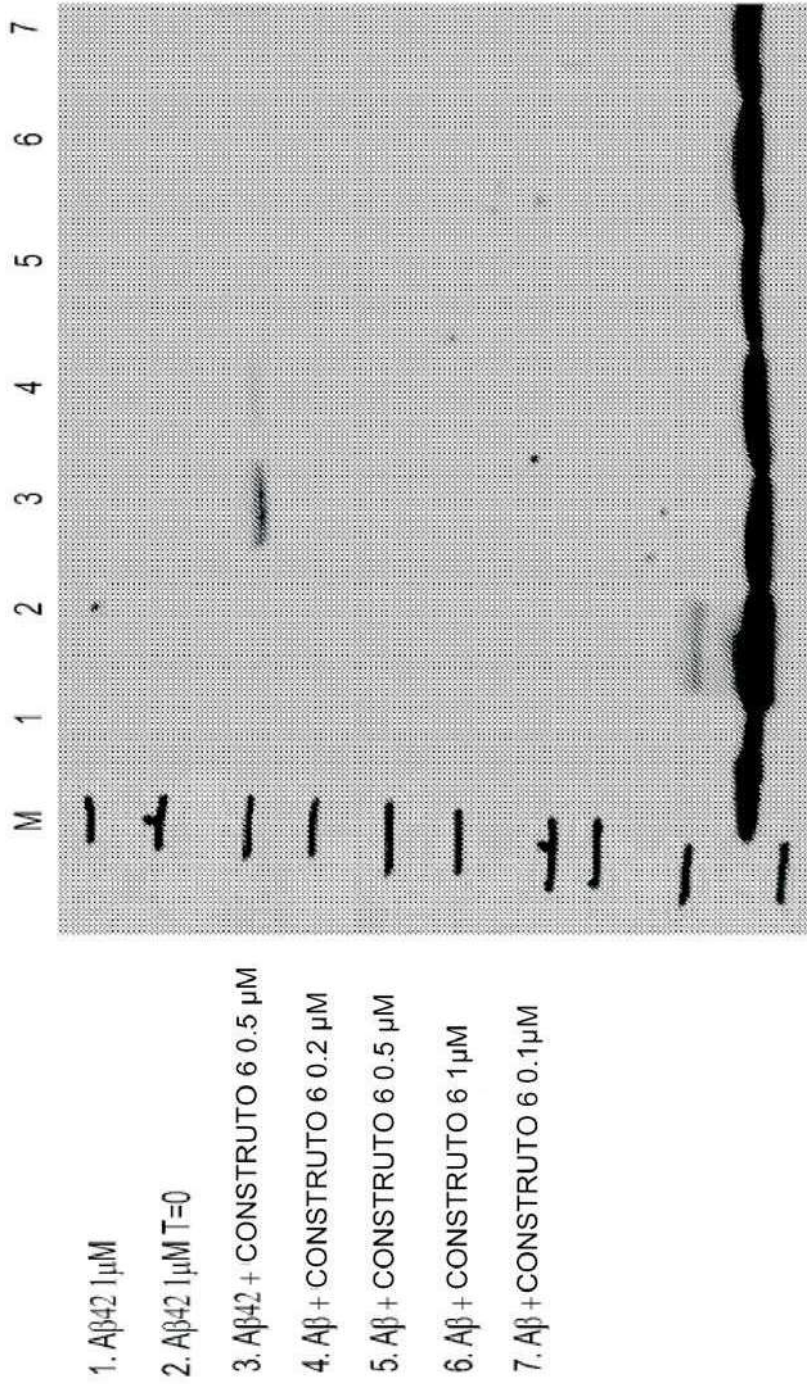
**FIG. 35**

FIG. 36A



**FIG. 36B**

**FIG. 37A**

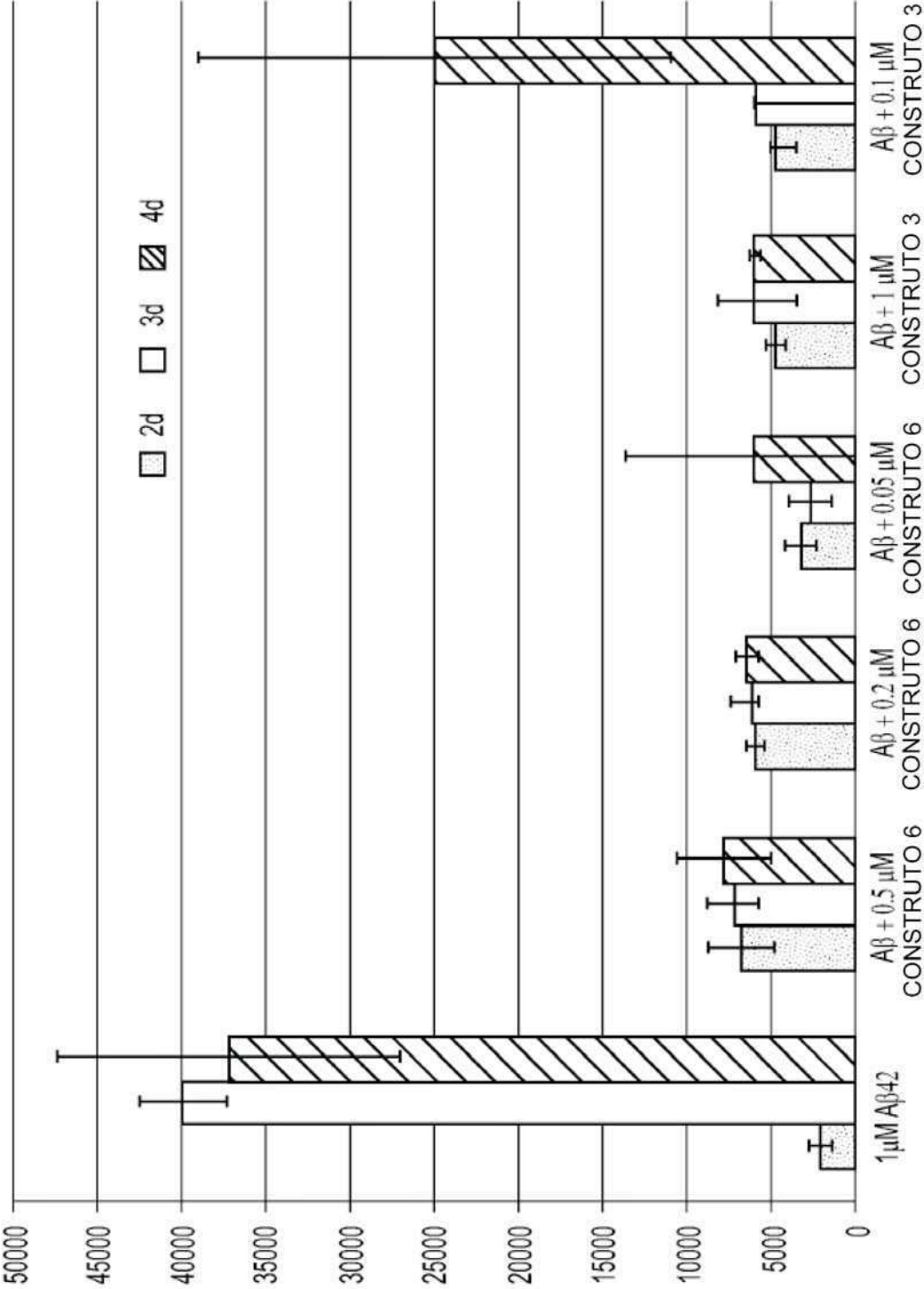
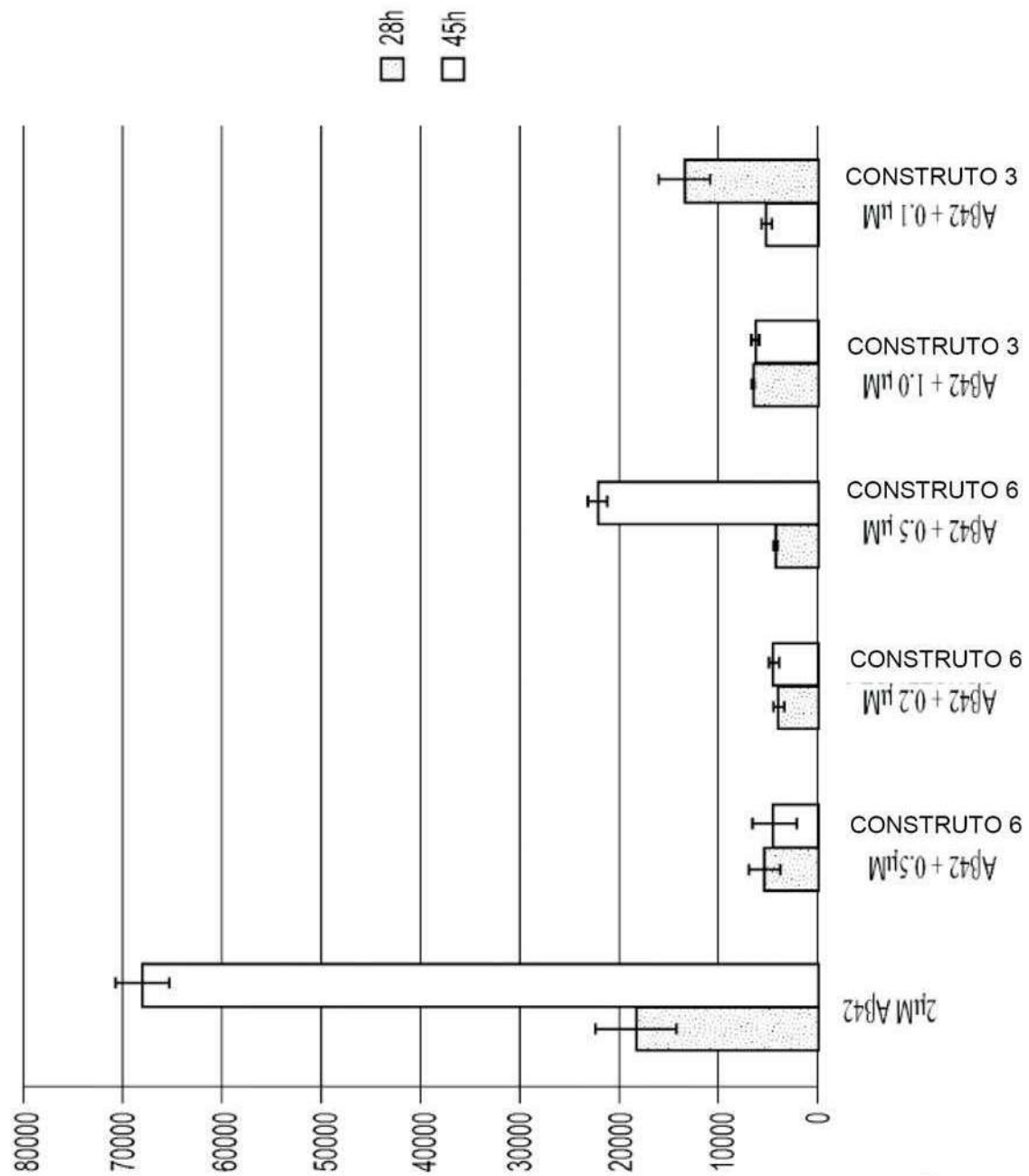
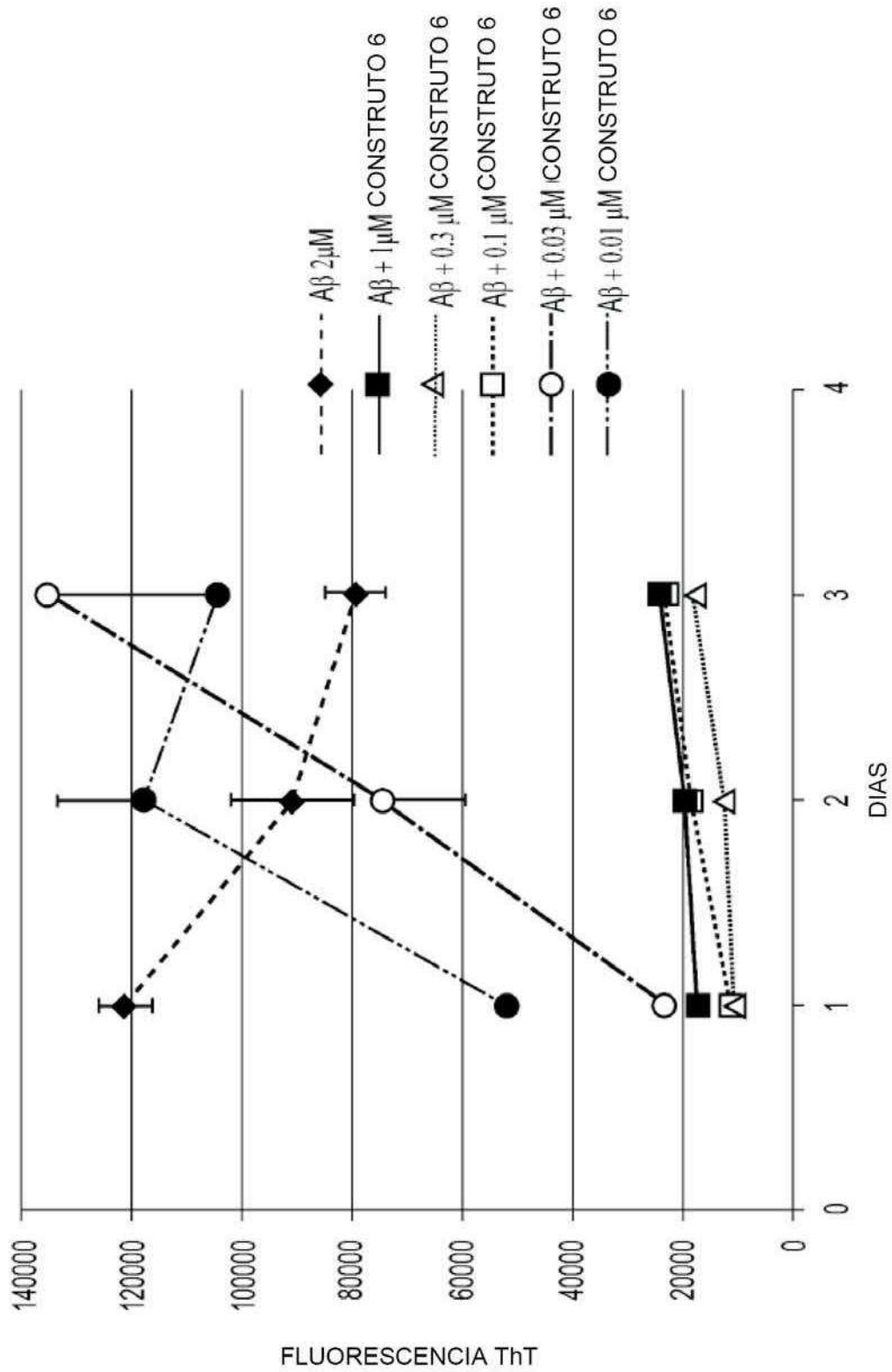


FIG. 37B

**FIG. 37C**

**FIG. 37D**

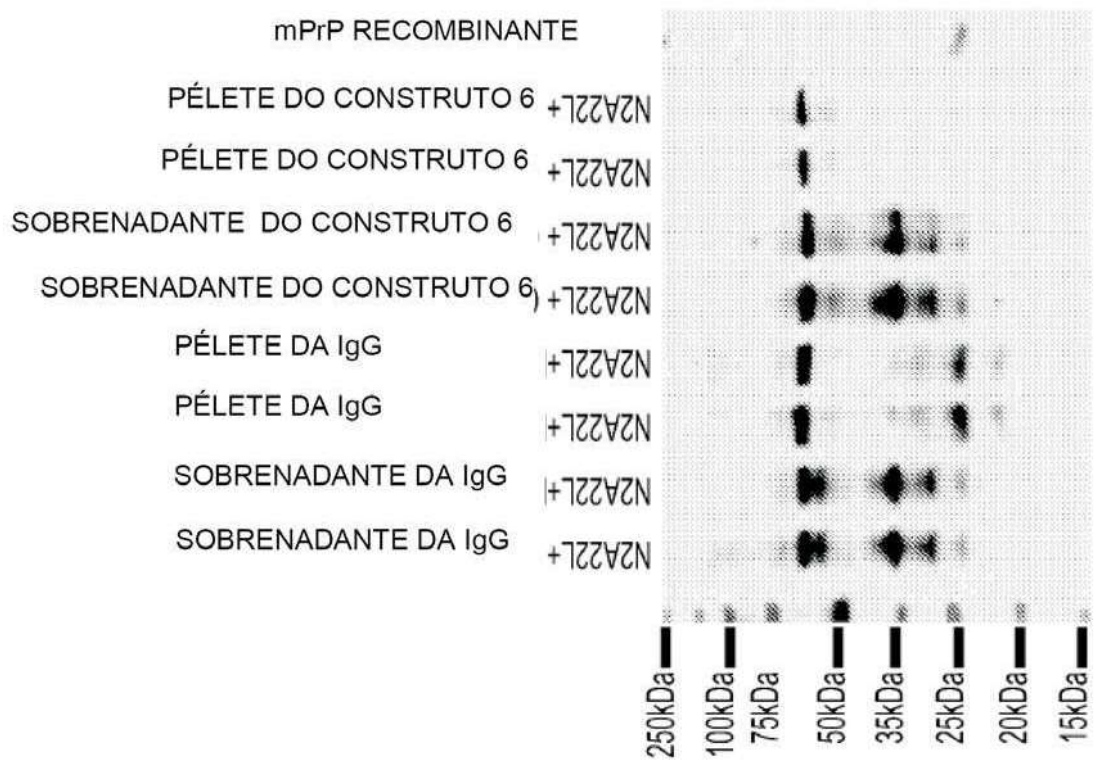


FIG. 38A

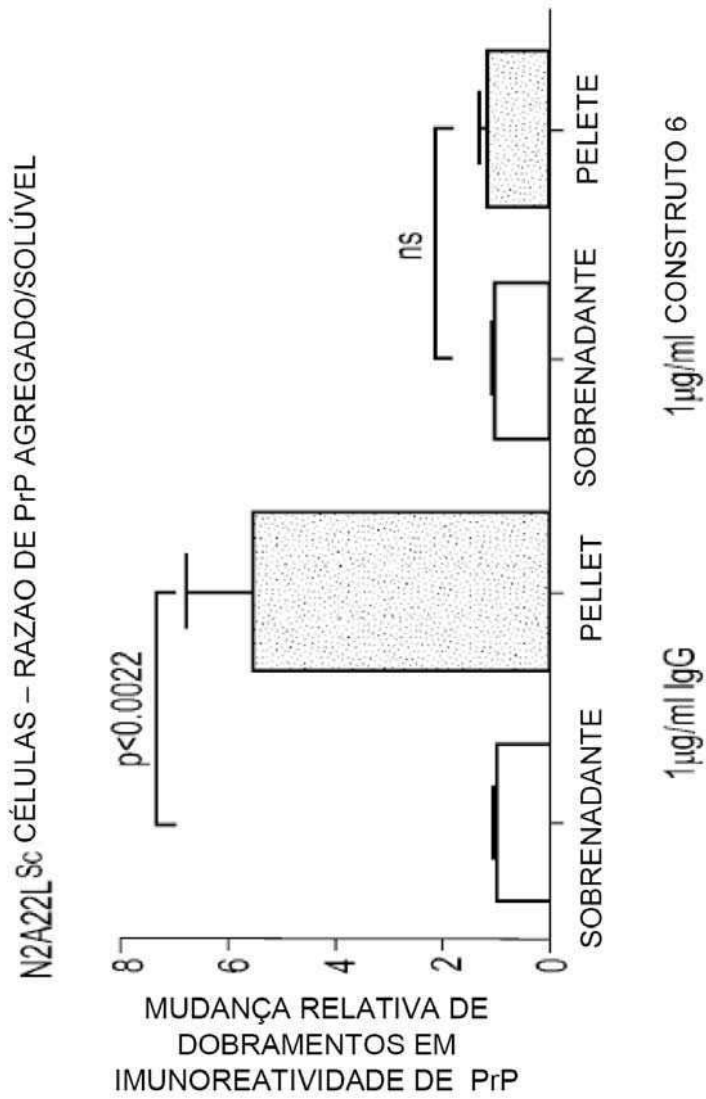


FIG. 38B

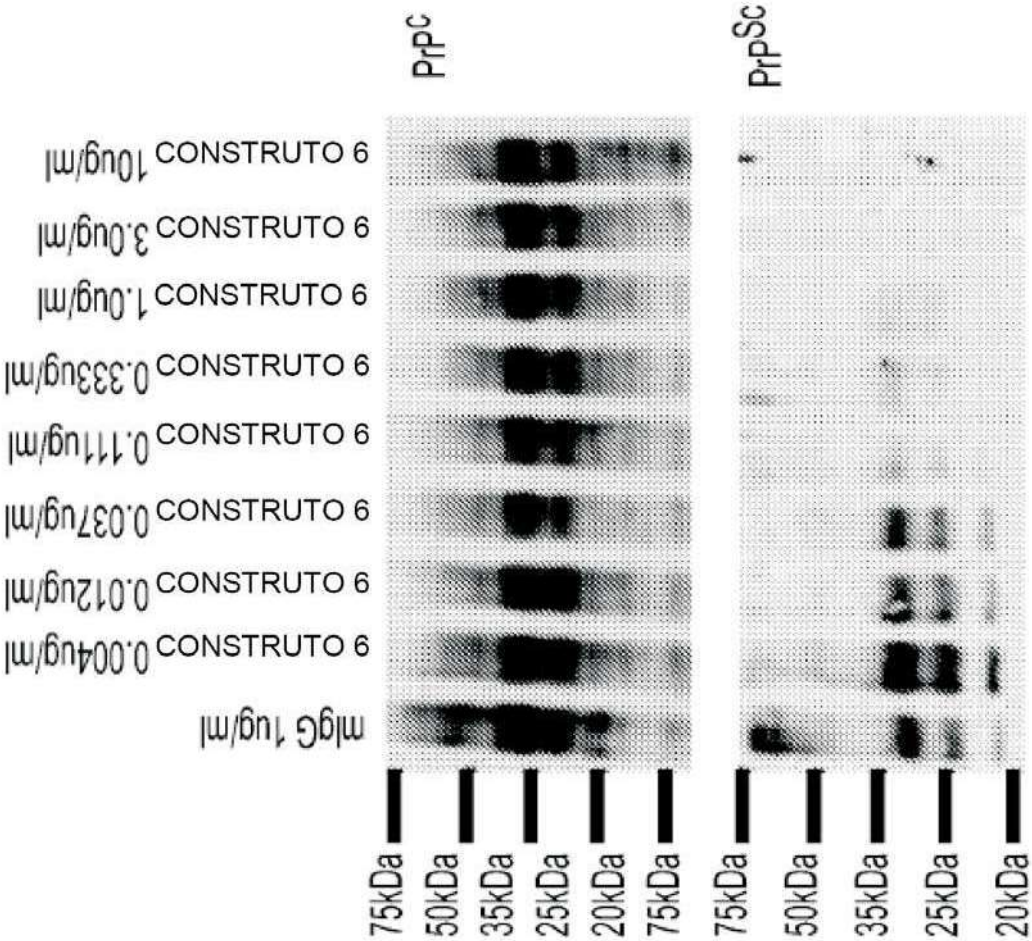


FIG. 39A

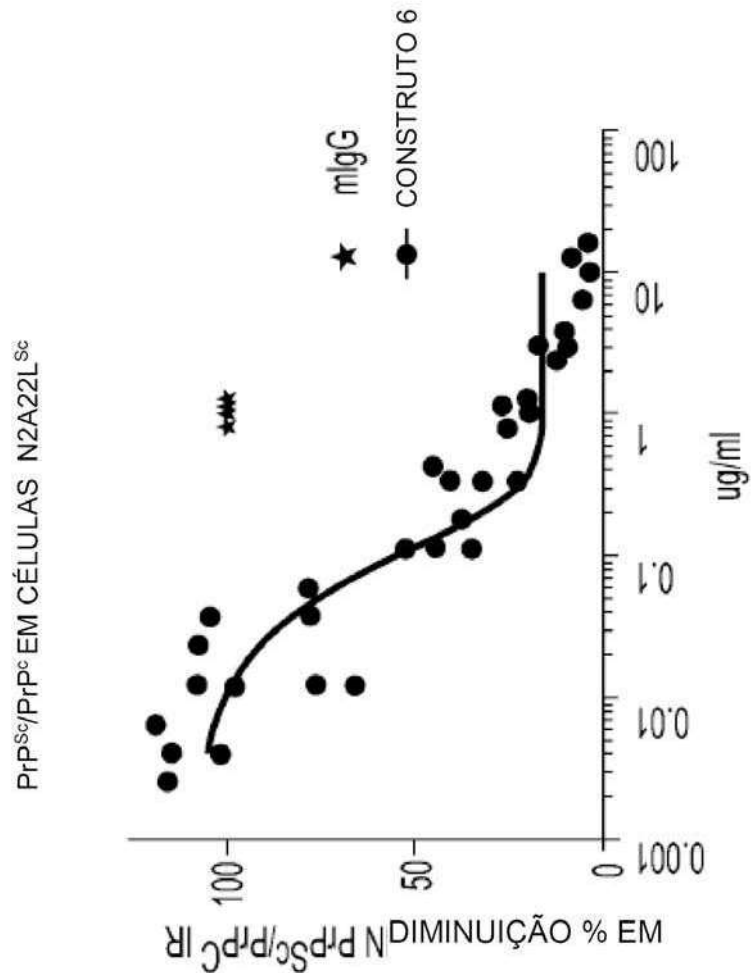


FIG. 39B

RESUMO

Patente de Invenção: **"COMPOSIÇÕES PARA TRATAMENTO DE DOENÇA ASSOCIADA COM PROTEÍNA AMILOIDE AGREGADA E PARA DETECTAR OU GERAR IMAGEM DE AMILOIDE AGREGADA E USO DAS REFERIDAS COMPOSIÇÕES"**.

A presente invenção refere-se a agentes e a composições farmacêuticas para a redução da formação de amiloide e/ou para a promoção da desagregação de proteínas amiloides. As composições também podem ser usadas para detectar amiloide.