



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

(11) PI 0821949-4 B1



(22) Data do Depósito: 29/12/2008

(45) Data de Concessão: 06/12/2022

(54) Título: ANTICORPOS OU FRAGMENTOS DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO DESTES, SEUS USOS, SEU MÉTODO DE PREPARAÇÃO, SUAS COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS, E HIBRIDOMAS

(51) Int.Cl.: C12P 21/08.

(30) Prioridade Unionista: 10/09/2008 US 61/095,932; 28/12/2007 US 61/007,544.

(73) Titular(es): UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH FOUNDATION; PROTHENA BIOSCIENCES LIMITED.

(72) Inventor(es): DALE B. SCHENK; PETER A. SEUBERT; JONATHAN WALL; JOSÉ W. SALDANHA.

(86) Pedido PCT: PCT US2008088493 de 29/12/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/086539 de 09/07/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 29/06/2010

(57) Resumo: ANTICORPOS OU FRAGMENTOS DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO DESTES, SEUS USOS, SEU MÉTODO DE PREPARAÇÃO, SUAS COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS, ÁCIDOS NUCLEICOS, CÉLULAS E HIBRIDOMAS. A presente invenção refere-se a métodos úteis para efetuar a profilaxia ou o tratamento de amiloidose, incluindo amiloidose AA e amiloidose AL, pela administração de peptídeos compreendendo neoepitopos, tais como fragmentos AA de uma região C-terminal de AA, e anticorpos específicos para neoepitopos em de proteínas amiloides agregadas, por exemplo, anticorpos específicos para a região C-terminal de fibrilas AA. Anticorpos para inibição de formação e/ou aumento da depuração dos depósitos amiloides em um paciente dessa forma efetuando profilaxia ou tratando a doenças amiloide.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"ANTICORPOS OU FRAGMENTOS DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO
DESTES, SEUS USOS, SEU MÉTODO DE PREPARAÇÃO, SUAS
COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS, E HIBRIDOMAS".**

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS DE PATENTE
RELACIONADOS

[0001] Prioridade é reivindicada sobre o Pedido de Patente Provisória Americana Nº 61/095.932, depositado em 10 de setembro de 2008, e sobre o Pedido de Patente Provisória Americana Nº 61/007.544 depositado em 28 de dezembro de 2007, cada um dos quais é incorporado neste pedido por referência em sua totalidade.

CAMPO TÉCNICO

[0002] A invenção reside nos campos técnicos de imunologia e medicina.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0003] Amiloidose é um termo geral que descreve diversas doenças caracterizadas pela existência de formas patológicas de proteínas amiloides, muitas vezes envolvendo a deposição extracelular de fibrilas proteicas, que formam "numerosos depósitos amiloides" ou "placas amiloides" que podem ocorrer em sítios locais ou sistematicamente. Estes depósitos ou placas são compostos principalmente de uma proteína ou peptídeo solúvel que ocorre naturalmente, montados em depósitos insolúveis extensos de 10 a 100 µm de diâmetro em uma variedade de sítios de tecido. Os depósitos são compostos geralmente de agregados laterais de fibrilas que têm aproximadamente 10 a 15 nm de diâmetro. Fibrilas amiloides produzem uma característica birrefringência de maçã verde à luz polarizada, quando marcado com o corante Congo Red. Geralmente, a composição fibrilar destes depósitos é uma identificação característica das várias formas da doença amiloide.

[0004] Os peptídeos ou proteínas que formam os depósitos de placa muitas vezes são produzidos a partir de uma proteína precursora maior. Mais especificamente, a patogênese de agregados amiloides, tais como depósitos de fibrila geralmente envolvem a clivagem proteolítica de uma proteína precursora "anormal" em fragmentos que agregam-se em folhas β antiparalelas dobradas.

[0005] A composição fibrilar destes depósitos é uma identificação característica de várias formas da doença amiloide. Por exemplo, depósitos intracerebrais e cerebrovasculares compostos principalmente de fibrilas do peptídeo beta amiloide (β -AP) são característicos da mal de Alzheimer (tanto formas familiares como esporádicas), peptídeo de proteína amiloide de ilhota (IAPP; amilina) é característico das fibrilas em depósitos amiloides de célula de ilhota pancreática associados com diabetes tipo II, e β 2-microglobulina é um dos principais componentes de depósitos amiloides que se formam como consequência do tratamento de hemodiálise de longo prazo. Mais recentemente, doenças associadas a prion, tais como doença de Creutzfeld-Jacob, também foram reconhecidas como doenças amiloides.

[0006] Em geral, amiloidoses primárias da doença são caracterizadas pela presença de fibrilas de proteína "tipo cadeia leve de amiloide" (tipo AL), como denominadas para a homologia da região N-terminal das fibrilas AL ao fragmento variável da cadeia leve da imunoglobulina (capa ou lambda).

[0007] As várias formas de doença foram divididas em classes, a maioria com base em se a amiloidose está associada com uma doença sistêmica subjacente. Dessa forma, certas desordens são consideradas ser amiloidoses primárias, nas quais não há nenhuma evidência de doença pré-existente ou coexistente. Em amiloidose secundária ou reativa (tipo AA) caracterizada pela presente deposição

de fibrilas de proteína A amiloide (AA), há um estado de doença inflamatório ou infeccioso crônico subjacente ou associado.

[0008] Amiloidoses heredofamiliares podem ter associadas depósitos neuropáticos, renais, ou cardiovasculares do tipo de transtiretina ATTR. Outras amiloidoses heredofamiliares incluem outras síndromes e podem ter componentes amiloides diferentes (*por exemplo*, Febre mediterrânea familiar que é caracterizada por fibrilas AA). Outras formas de amiloidose incluem formas locais, caracterizadas por depósitos focais, muitas vezes similares a tumor que ocorrem em órgãos isolados. Outras amiloidoses são associadas com o envelhecimento, e são comumente caracterizadas pela formação de placa no coração ou cérebro. Também são comuns depósitos amiloides associados com hemodiálise de longo prazo. Estas e outras formas da doença amiloide são resumidas na Tabela 1 (Tan, S.Y. and Pepys, Histopathology 25:403-414, 1994; Harrison's Handbook of Internal Medicine, 13th Ed., Isselbacher, K.J. et al, eds, McGraw-Hill, San Francisco, 1995) e são descritos nas Patentes Americanas N^{os} 6.875.434, 6.890.535, 6.913.745, 6.923.964, e 6.936.246, que são incorporados por referência neste pedido em sua totalidade.

Tabela 1

| Classificação de Doenças Amiloides | | | |
|------------------------------------|---|--------------------------|---|
| Proteína/ Peptídeo Amiloide | Proteína Precursora | Proteínas Vari- antes | Clínica |
| AA | Proteína Ami- loide A Sérica (ApoSSA) | | Amiloidose Reativa (se- cundária): Febre Mediterrânea Fa- miliar Neuropatia amiloide fa- miliar com urticária e surdez (Síndrome de (Muckle-Wells) |

| Classificação de Doenças Amiloides | | | |
|------------------------------------|---|--|---|
| AA | Proteína Amiloide A Sérica (ApoSSA) | | Amiloidose reativa sistêmica associada com doenças inflamatórias sistêmicas |
| AL | Cadeias leves de imunoglobulina monoclonal (capa, lambda) | Ak, A, (por exemplo, AkIII) | Amiloidose Idiopática (primária): associada a mieloma ou macroglobulinemia; amiloidose sistêmica associada com discrasia imunocítica; gamopatia monoclonal; discrasia oculta, amiloidose nodular local associada com doenças inflamatórias crônicas |
| AH | IgG (1(γ1)) | Aγ1 | Amiloidose de cadeia pesada associada com diversas discrasias |
| ATTR | Transtiretina (TTR) | Pelo menos 30 mutações pontuais conhecidas | Poloneuropatia amiloide familiar (por exemplo, Met 30, Portuguesa) |
| ATTR | Transtiretina (TTR) | por exemplo, Met 111 | Cardiopatia amiloide familiar (Dinamarquesa) |
| ATTR | Transtiretina (TTR) | TTR selvagem ou I1e 122 | Amiloidose senil sistêmica |
| AapoAI | ApoAI | Arg 26 | Polineuropatia amiloide familiar |
| Agel | Gelsolina | Asn 187 | Amiloidose familiar (Finlandesa) |
| Acys | Cistatina C | Gln 68 | Hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (Islandesa) |
| Aβ | Precursor de proteína amiloide β (por exemplo, β-APP ₆₉₅) | Diversos: Gln 618, | Mal de Alzheimer Síndrome de Down Hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (Holandesa) Angiopatia amiloide cerebral esporádica Miosite por corpúsculo de inclusão |
| AB ₂ M | Beta ₂ microglobulina | | Associada com hemodiálise crônica |

| Classificação de Doenças Amiloides | | | |
|---|---|------------------------------------|---|
| Acal | (Pro)calcitonin | (Pró)calcitonina | Carcinoma medular de tireoide |
| AANF A β SVEP ^a AB ₂ M | Fator natriurético atrial Proteína precursora β -amiloide - Beta ₂ microglobulina | | Amiloidoses Senis Focais: Amiloide atrial isolada Cérebro Vesículas seminais Próstata |
| | Queratina | | Amiloide cutânea primária localizada (macular, papular) |
| PrP | Proteína precursora de príon (forma celular de 33 a 35 kDa) | Proteína de scrapie 27 a 30 kDa | Doença esporádica de Creutzfeldt-Jacob Doença Kuru (encefalopatias espongiformes transmissíveis, doenças de príon) |
| AIAPP | Polipeptídeo amiloide de ilhota (IAPP) | | Ilhotas de Langerhans Diabetes tipo II, Insulinoma |
| Hormônios, fragmentos peptídicos | por exemplo, pré-calcitonina | | Amiloidose exócrina, associada com APU-Domas |

^aProteína exócrina de vesícula seminal

[0009] Muitas vezes, fibrilas formando a maioria de um depósito amiloide são derivadas de uma ou mais proteínas ou peptídeos precursores primários, e associados normalmente com glicoaminoglicanos sulfatados. Além disso, depósitos amiloides podem incluir proteínas e peptídeos menores de vários tipos, junto com outros componentes, tais como proteoglicanos, gangliosídeos e outros açúcares, como descrito em mais detalhes nas seções que seguem.

[00010] Fibrilas AA são compostas de fragmentos peptídicos que variam de tamanho, mas têm geralmente aproximadamente 8000 daltons (peptídeo ou proteína AA) formadas pela clivagem proteolítica da proteína amiloide A sérica (SSA), uma apolipoproteína circulante que está presente em partículas HDL e que é sintetizada em

hepatócitos em resposta a tais citocinas como interleucina (IL)-1 e IL-6, bem como fator de necrose tumoral α . Ver Husby, G. et al. *Amyloid* 1, 119-137 (1994). A clivagem proteolítica resulta na deposição patológica de dois terços do N-terminal de ~76 resíduos de uma proteína SAA. Em humanos, a concentração plasmática de SAA normalmente é ~0,1 mg/ml mas pode aumentar acima de 1.000 vezes em resposta a um estímulo inflamatório. Como parte deste processo, a molécula SAA sofre proteólise e o produto de clivagem N-terminal é depositado sistemicamente como fibrilas AA em órgãos vitais, incluindo fígado, baço, rins, e glândulas adrenais. A deposição é também comum no coração e trato gastrointestinal.

[00011] Geralmente, amiloidose AA é uma manifestação de doenças que provocam uma resposta de fase aguda sustentada. Tais doenças incluem desordens inflamatórias crônicas, infecções microbianas locais ou sistêmicas crônicas e neoplasias malignas. Doenças amiloides AA incluem, mas não são limitadas a doenças inflamatórias, tais como artrite reumatoide, artrite crônica juvenil, espondilite anquilosante, psoríase, artropatia psoriática, síndrome de Reiter, doença de Still do Adulto, síndrome de Behcet e doença de Crohn. Depósitos de AA também são produzidos em consequência de infecções microbianas crônicas, tais como lepra, tuberculose, bronquiectasia, úlceras de decúbito, polinefrite crônica, osteomielite e doença de Whipple. Certas neoplasias malignas também podem resultar em depósitos amiloides de fibrila AA. Estas incluem condições, tais como linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas de intestino, pulmão e trato urogenital, carcinoma de célula basal, e leucemia de célula cabeluda. Doença amiloide AA também pode resultar de doenças inflamatórias herdadas, tais como Febre Mediterrânea Familiar. Adicionalmente, doença amiloide AA pode resultar de desordens linfoproliferativas, tais como Doença de

Castleman.

[00012] Amiloidose AA é insidiosa e progressiva. Sintomas são geralmente apresentados em estágios tardios da doença. Frequentemente o paciente não é diagnosticado até que dano significativo ao órgão tenha ocorrido. Fibrilas AA são depositadas em órgãos vitais levando a disfunção do órgão e posteriormente à morte. A taxa de sobrevida em cinco anos é 45 a 50%. A sobrevida mediana após diagnóstico é 4 a 8 anos. Doença Renal em estágio terminal é a causa da morte em 40 a 60% de casos. Ver Gillmore J.D. et al., *Lancet* 358:24-9 (2001).

[00013] Atualmente, não há nenhum tratamento específico, direcionado a amiloide aprovado para nenhuma das doenças amiloides, incluindo Amiloidose AA. Ver Gillmore J.D. et al., *Lancet* 358:24-9 (2001). Onde há um estado de doença subjacente ou associado, terapia direcionada em direção à redução da produção da proteína amiloidogênica pelo tratamento da doença subjacente. Por exemplo, estratégia de tratamento corrente da Amiloidose AA é visar a inflamação subjacente, reduzindo níveis de ApoSSA abaixo de 10mg/l. Terapias atualmente empregadas incluem quimioterapia (clorambucil e MTX), imunossupressores (azatioprina), fármacos anti-inflamatórios (colchicina) e inibidores de TNF. A invenção dessa forma cumpre uma necessidade existente há muito tempo de regimes terapêuticos para prevenir ou melhorar os efeitos de Amiloidose AA.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[00014] A presente invenção fornece um anticorpo humano, humanizado, ou quimérico isolado, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que se liga especificamente a um epitopo nos resíduos 70 a 76 do peptídeo amiloide A humano, por exemplo, um epitopo nos resíduos 70 a 76 da SEQ ID N^o: 2 ou um epitopo compreendendo resíduos apresentados como SEQ ID N^{os}: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11.

Anticorpos ou fragmentos de ligação a antígeno da invenção incluem aqueles que competem pela ligação ao peptídeo amiloide A humano com o anticorpo 2A4 produzido pelo Número de acesso no ATCC ____ ou com o anticorpo 7D8 produzido pelo Número de acesso no ATCC _____. Anticorpos adicionais da invenção competem pela ligação ao peptídeo amiloide A humano com um anticorpo tendo uma região variável da cadeia leve apresentada como resíduos 20 a 131 da SEQ ID Nº: 152 ou resíduos 20 a 131 da 153 e uma região variável da cadeia pesada apresentada como resíduos 20 a 138 da SEQ ID Nº: 154.

[00015] Os anticorpos revelados incluem versões humanizadas e quiméricas do anticorpo 2A4 produzido pelo Número de acesso no ATCC ____ ou uma versão humanizada ou quimérica do anticorpo 7D8 produzido pelo Número de acesso no ATCC _____.

[00016] Por exemplo, anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno representativos compreendem uma região variável da cadeia leve compreendendo uma ou mais regiões de complementaridade de uma região variável da cadeia leve de 2A4 apresentada como resíduos 20 a 131 da SEQ ID Nº: 152 ou uma ou mais regiões de complementaridade de uma região variável da cadeia leve de 7D8 apresentada como resíduos 20 a 131 da SEQ ID Nº: 153. Como outro exemplo, anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno representativos compreendem uma região variável da cadeia leve compreendendo duas regiões de complementaridade de uma região variável da cadeia leve de 2A4 apresentada como resíduos 20 a 131 da SEQ ID Nº: 152 ou duas regiões de complementaridade de uma região variável da cadeia leve de 7D8 apresentada como resíduos 20 a 131 da SEQ ID Nº: 153. Anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno representativos adicionais compreendem uma região variável da cadeia leve compreendendo três regiões de complementaridade de

uma região variável da cadeia leve de 2A4 apresentada como resíduos 20 a 131 da SEQ ID Nº: 152 ou três regiões de complementaridade de uma região variável da cadeia leve de 7D8 apresentada como resíduos 20 a 131 da SEQ ID Nº: 153. Versões humanizadas representativas de um anticorpo 2A4 ou 7D8 compreende pelo menos um resíduo de região conservada da cadeia leve selecionado a partir do grupo consistindo em L87 e L90 (convenção de numeração Kabat), que é ocupado por Y e F, respectivamente, e em que o resto da região variável da cadeia leve é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia leve da imunoglobulina aceptora humana. Anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno representativos compreendem pelo menos um resíduo de região conservada da cadeia leve selecionado a partir do grupo consistindo em +7, +14, +15, +17, +18, +50, +75, +88, + 92 e +109 (numeração linear), que é ocupado por T, S, L, D, Q, K, Y, L, F e L, respectivamente, e em que o resto da região variável da cadeia leve é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia leve da imunoglobulina aceptora humana. Por exemplo, anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno representativos compreendem pelo menos um resíduo de região conservada da cadeia leve selecionado a partir do grupo consistindo em +75 e +92 (numeração linear), que é ocupado por Y e F, respectivamente, e em que o resto da região variável da cadeia leve é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia leve da imunoglobulina aceptora humana. Em outros anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno representativos da invenção, a região variável da cadeia leve compreende um resíduo de região conservada em +105 (numeração linear) ocupado por Q.

[00017] Por exemplo, anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno da invenção incluem aqueles compreendendo uma região

variável da cadeia leve compreendendo um resíduo de região conservada em +7 (numeração linear) ocupado por T, em que o resto da região variável da cadeia leve é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia leve da imunoglobulina aceptora humana; anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno de uma região variável da cadeia leve compreendendo um resíduo de região conservada em +14 (numeração linear) ocupado por S, em que o resto da região variável da cadeia leve é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia leve da imunoglobulina aceptora humana; anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno de uma região variável da cadeia leve que compreende um resíduo de região conservada em +15 (numeração linear) ocupado por L, em que o resto da região variável da cadeia leve é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia leve da imunoglobulina aceptora humana; anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno de uma região variável da cadeia leve compreendendo um resíduo de região conservada em +17 (numeração linear) ocupado por D, em que o resto da região variável da cadeia leve é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia leve da imunoglobulina aceptora humana; anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno de uma região variável da cadeia leve compreendendo um resíduo de região conservada em +18 (numeração linear) ocupado por Q, em que o resto da região variável da cadeia leve é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia leve da imunoglobulina aceptora humana; anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno de uma região variável da cadeia leve compreendendo um resíduo de região conservada em +50 (numeração linear) ocupado por K, em que o resto da região variável da cadeia leve é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia leve da imunoglobulina aceptora humana; anticorpos e fragmentos de ligação

a antígeno de uma região variável da cadeia leve que compreende um resíduo de região conservada em +75 (numeração linear) ocupado por Y, em que o resto da região variável da cadeia leve é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia leve da imunoglobulina aceptora humana; anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno de uma região variável da cadeia leve compreendendo um resíduo de região conservada em +88 (numeração linear) ocupado por L, em que o resto da região variável da cadeia leve é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia leve da imunoglobulina aceptora humana; anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno de uma região variável da cadeia leve compreendendo um resíduo de região conservada em +92 (numeração linear) ocupado por F, em que o resto da região variável da cadeia leve é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia leve da imunoglobulina aceptora humana; anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno de uma região variável da cadeia leve compreendendo um resíduo de região conservada em +109 (numeração linear) ocupado por L, em que o resto da região variável da cadeia leve é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia leve da imunoglobulina aceptora humana; e anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno de uma região variável da cadeia leve compreendendo um resíduo de região conservada em +105 (numeração linear) ocupado por Q, em que o resto da região variável da cadeia leve é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia leve da imunoglobulina aceptora humana.

[00018] Regiões variáveis da cadeia leve da imunoglobulina aceptora humana usadas na invenção incluem a região variável da cadeia leve capa subgrupo 2 humana (convenção Kabat), por exemplo, região variável da cadeia leve subgrupo 2 humana da linhagem germinativa humana VKIIA19/A3, tal como região variável da

cadeia leve Vk humana compreendendo uma sequência apresentada como SEQ ID NO: 166 ou 167. Em aspectos particulares da invenção, anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno compreendem uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como resíduos 20 a 131 da SEQ ID Nº: 152, resíduos 20 a 131 da SEQ ID Nº: 153, ou apresentadas como SEQ ID Nº: 155, 156, 157, 158, 159, 160, 174, 175 ou 176.

[00019] Anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno representativos da invenção também incluem aqueles compreendendo uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma ou mais regiões de complementaridade de uma região variável da cadeia pesada de 2A4 apresentada como resíduos 20 a 138 da SEQ ID Nº: 154, por exemplo, uma região variável da cadeia pesada compreendendo duas regiões de complementaridade de uma região variável da cadeia pesada de 2A4 apresentada como resíduos 20 a 138 da SEQ ID Nº: 154, ou uma região variável da cadeia pesada compreendendo três regiões de complementaridade de uma região variável da cadeia pesada de 2A4 apresentada como resíduos 20 a 138 da SEQ ID Nº: 154. Anticorpos 2A4 e 7D8 e fragmentos de ligação a antígeno humanizados representativos compreendem pelo menos um resíduo de região conservada da cadeia pesada selecionado a partir do grupo consistindo em H37, H49, H70 e H93 (convenção de numeração Kabat), que é ocupado por I, A, F ou V, respectivamente, e em que o resto da região variável da cadeia pesada é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia pesada da imunoglobulina aceptora humana. Anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno humanizados representativos compreendem pelo menos um resíduo de região conservada da cadeia pesada selecionado a partir do grupo consistindo em +10, +15, +19, +37, +49, +73, +78, +79, +80, +87, +95, +99, +119 (numeração linear), que é ocupado por R, K,

K, I, A, F, Q, S, M, N, M, V ou A, respectivamente, e em que o resto da região variável da cadeia pesada é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia pesada da imunoglobulina aceptora humana. Por exemplo, anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno humanizados representativos compreendem pelo menos um resíduo de região conservada da cadeia pesada selecionado a partir do grupo consistindo em +37, +49, +73 e +99 (numeração linear), que é ocupado por I, A, F ou V, respectivamente, e em que o resto da região variável da cadeia pesada é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia pesada da imunoglobulina aceptora humana.

[00020] Por exemplo, anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno da invenção incluem aqueles compreendendo uma região variável da cadeia pesada compreendendo um resíduo de região conservada em +10 (numeração linear) ocupado por R, em que o resto da região variável da cadeia pesada é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia pesada da imunoglobulina aceptora humana; anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno de uma região variável da cadeia pesada compreendendo um resíduo de região conservada em +15 (numeração linear) ocupado por K, em que o resto da região variável da cadeia pesada é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia pesada da imunoglobulina aceptora humana; anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno de uma região variável da cadeia pesada compreendendo um resíduo de região conservada em +19 (numeração linear) ocupado por K, em que o resto da região variável da cadeia pesada é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia pesada da imunoglobulina aceptora humana; anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno de uma região variável da cadeia pesada compreendendo um resíduo de região conservada

em +37 (numeração linear) ocupado por I, em que o resto da região variável da cadeia pesada é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia pesada da imunoglobulina aceptora humana; anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno de uma região variável da cadeia pesada compreendendo um resíduo de região conservada em +49 (numeração linear) ocupado por A, em que o resto da região variável da cadeia pesada é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia pesada da imunoglobulina aceptora humana; anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno de uma região variável da cadeia pesada compreendendo um resíduo de região conservada em +73 (numeração linear) ocupado por F, em que o resto da região variável da cadeia pesada é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia pesada da imunoglobulina aceptora humana; anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno de uma região variável da cadeia pesada compreendendo um resíduo de região conservada em +78 (numeração linear) ocupado por Q, em que o resto da região variável da cadeia pesada é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia pesada da imunoglobulina aceptora humana; anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno de uma região variável da cadeia pesada compreendendo um resíduo de região conservada em +79 (numeração linear) ocupado por S, em que o resto da região variável da cadeia pesada é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia pesada da imunoglobulina aceptora humana; anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno de uma região variável da cadeia pesada compreendendo um resíduo de região conservada em +80 (numeração linear) ocupado por M, em que o resto da região variável da cadeia pesada é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia pesada da imunoglobulina aceptora humana; anticorpos e fragmentos de ligação

a antígeno de uma região variável da cadeia pesada compreendendo um resíduo de região conservada em +87 (numeração linear) ocupado por N, em que o resto da região variável da cadeia pesada é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia pesada da imunoglobulina aceptora humana; anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno de uma região variável da cadeia pesada compreendendo um resíduo de região conservada em +95 (numeração linear) ocupado por M, em que o resto da região variável da cadeia pesada é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia pesada da imunoglobulina aceptora humana; anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno de uma região variável da cadeia pesada compreendendo um resíduo de região conservada em +99 (numeração linear) ocupado por V, em que o resto da região variável da cadeia pesada é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia pesada da imunoglobulina aceptora humana; e anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno de uma região variável da cadeia pesada compreendendo um resíduo de região conservada em +109 (numeração linear) ocupado por A, em que o resto da região variável da cadeia pesada é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável da cadeia pesada da imunoglobulina aceptora humana.

[00021] Regiões variáveis da cadeia pesada da imunoglobulina aceptora humana incluem uma região variável da cadeia pesada gama subgrupo 3 humana (convenção Kabat), por exemplo, região variável da cadeia pesada gama subgrupo 3 humana compreendendo uma sequência apresentada como SEQ ID N^o: 165, tal como uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como resíduos 20 a 138 da SEQ ID N^o: 154 ou apresentada como SEQ ID N^o: 161, 162 ou 163.

[00022] Anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno

representativos adicionais compreendem uma região variável da cadeia leve compreendendo três regiões de determinação de complementaridade de uma região variável da cadeia leve de 2A4 apresentada como resíduos 20 a 131 da SEQ ID N^o: 152 ou três regiões de complementaridade de uma região variável da cadeia leve de 7D8 apresentada como resíduos 20 a 131 da SEQ ID N^o: 153, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo três regiões de complementaridade de uma região variável da cadeia pesada de 2A4 apresentada como resíduos 20 a 138 da SEQ ID N^o: 154. Por exemplo, tais anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno incluem aqueles tendo uma região variável da cadeia leve compreendendo três regiões de determinação de complementaridade apresentadas como SEQ ID N^{os}: 168, 169 e 170, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo três regiões de complementaridade apresentadas como SEQ ID N^{os}: 171, 172 e 173. Como outro exemplo, tais anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno incluem aqueles tendo uma região variável da cadeia leve compreendendo três regiões de determinação de complementaridade apresentadas como SEQ ID N^{os}: 177, 169 e 170, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo três regiões de complementaridade apresentadas como SEQ ID N^{os}: 171, 172 e 173. Como outro exemplo, tais anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno incluem aqueles compreendendo uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como resíduos 20 a 131 da SEQ ID N^o: 152 ou como resíduos 20 a 131 da SEQ ID N^o: 153, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como resíduos 20 a 138 da SEQ ID N^o: 154. Como outro exemplo, tais anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno incluem aqueles tendo uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como

SEQ ID Nº: 155, 156, 157, 158, 159, 160, 174, 175 ou 176, e região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 161, 162 ou 163.

[00023] Em aspectos particulares da invenção, um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno compreende uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 155, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 161; uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 155, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 162; uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 155, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 163; uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 156, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 161; uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 156, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 162; uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 156, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 163; uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 157, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos

apresentada como SEQ ID Nº: 161; uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 157, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 162; uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 157, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 163; uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 158, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 161; uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 158, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 162; uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 158, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 163; uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 159, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 161; uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 159, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 162; uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 159, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 163; uma região

variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 160, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID No: 161; uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 160, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 162; uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 160, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 163; SEQ ID Nº: 174, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 161; uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 174, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 162; uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 174, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 163; uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 175, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 161; uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 175, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 162; uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 175, e uma região variável da cadeia pesada

compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 163; uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 176, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 161; uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 176, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 162; ou uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 176, e uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 163.

[00024] Também são fornecidos ácidos nucleicos isolados que codificam um anticorpo humano, humanizado ou quimérico, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que se liga especificamente a um epítipo nos resíduos 70 a 76 do peptídeo amiloide A humano, incluindo tais anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno como descrito neste pedido acima e como apresentados nas reivindicações. Ainda são fornecidas células expressando tais ácidos nucleicos.

[00025] Em outros aspectos, a presente invenção fornece um anticorpo isolado, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que se liga especificamente a um epítipo compreendendo X_1EDX_2 em um agregado de proteína amiloide, em que X_1 e X_2 são qualquer aminoácido. Tais anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno incluem anticorpos humanos, humanizados ou quiméricos, e fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, por exemplo, aqueles que se ligam especificamente a um epítipo nos resíduos 70 a 76 do peptídeo amiloide A humano.

[00026] Anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno representativos adicionais incluem aqueles em que X_1 é H, T, F, S, P, A, L, C, Q, R, E, K, D, G, V, Y, I ou W, e em que X_2 é T, S, E, R, I, V, F, D, A, G, M, L, N, P, C, K, Y, ou Q; ou X_1 é H, T, F, S, P, ou A e em que X_2 é T, S, E, R, I, V, F, D ou A; ou X_1 é H, T, F ou A; ou X_2 é T, S, E, D ou A; ou X_1 é H, T, F, ou A e X_2 são T, S, E, D ou A; ou X_1 é H, T ou A e X_2 são T, S, E ou A; ou X_1 é H ou A e X_2 é T, S ou A; ou X_1 é H e X_2 é T ou A; ou X_1 é A e X_2 é S, T, E ou V; ou X_1 é A e X_2 é S, T ou E; ou X_1 é T e X_2 é E; ou X_1 é F e X_2 é D; ou X_1 é S e X_2 é E, F ou A; ou X_1 é P e X_2 é E, I ou F. Por exemplo, tais anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno ligam-se a um epítipo consistindo em uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em GHEDT (SEQ ID Nº: 3), HEDT (SEQ ID Nº: 12), AEDS (SEQ ID Nº: 13), AEDT (SEQ ID Nº: 14), HEDA (SEQ ID Nº: 15), TEDE (SEQ ID Nº: 16), FEDD (SEQ ID Nº: 17), SEDE (SEQ ID Nº: 18), AEDE (SEQ ID Nº: 19), PEDE (SEQ ID Nº: 20), PEDI (SEQ ID Nº: 21), PEDF (SEQ ID Nº: 22), AEDV (SEQ ID Nº: 23), SEDF (SEQ ID Nº: 24) e SEDA (SEQ ID Nº: 25); ou um epítipo consistindo em uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em GHEDT (SEQ ID Nº: 3), HEDT (SEQ ID Nº: 12), AEDS (SEQ ID Nº: 13), AEDT (SEQ ID Nº: 14), HEDA (SEQ ID Nº: 15), TEDE (SEQ ID Nº: 16), FEDD (SEQ ID Nº: 17), SEDE (SEQ ID Nº: 18), AEDE (SEQ ID Nº: 19), PEDE (SEQ ID Nº: 20), PEDI (SEQ ID Nº: 21), PEDF (SEQ ID Nº: 22), SEDF (SEQ ID Nº: 24) e SEDA (SEQ ID Nº: 25); ou um epítipo consistindo em uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em GHEDT (SEQ ID Nº: 3), HEDT (SEQ ID Nº: 12), AEDS (SEQ ID Nº: 13), AEDT (SEQ ID Nº: 14), HEDA (SEQ ID Nº: 15) e TEDE (SEQ ID Nº: 16). Os epítopos revelados podem ser encontrados em um agregado de proteína amiloide, por exemplo, um epítipo compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a

partir do grupo consistindo em GHGAEDS (SEQ ID Nº: 4), GHDAEDS (SEQ ID Nº: 5), GDHAEDS (SEQ ID Nº: 7), STVIEDS (SEQ ID Nº: 8) e GRGHEDT (SEQ ID Nº: 9); ou um epitopo compreendendo uma sequência de aminoácidos GHGAEDS (SEQ ID Nº:4); ou um epitopo compreendendo aminoácidos HEDT (SEQ ID Nº: 12); ou um epitopo compreendendo aminoácidos HEDA (SEQ ID Nº: 15); ou um epitopo compreendendo aminoácidos AEDS (SEQ ID Nº: 13) ou um epitopo compreendendo aminoácidos AEDT (SEQ ID Nº: 14); ou um epitopo compreendendo aminoácidos TEDE (SEQ ID Nº: 16); ou um epitopo compreendendo a sequência de aminoácidos AEDV (SEQ ID Nº: 23); ou um epitopo compreendendo a sequência de aminoácidos SEDF (SEQ ID Nº: 24) ou PEDF (SEQ ID Nº: 22); ou um epitopo compreendendo uma sequência amino selecionada a partir do grupo consistindo em PEDS (SEQ ID Nº: 26), PEDL (SEQ ID Nº: 27), TEDV (SEQ ID Nº: 28), AEDE (SEQ ID Nº: 19), SEDI (SEQ ID Nº: 29) e TEDT (SEQ ID Nº: 30); ou um epitopo compreendendo uma sequência amino selecionada a partir do grupo consistindo em LEDG (SEQ ID Nº: 31), AEDM (SEQ ID Nº: 32), HEDS (SEQ ID Nº: 33), CEDD (SEQ ID Nº: 34), QEDS (SEQ ID Nº: 35), REDS (SEQ ID Nº: 36), TEDG (SEQ ID Nº: 16), QEDR (SEQ ID Nº: 38), TEDL (SEQ ID Nº: 39), PEDN (SEQ ID Nº: 40), EEDP (SEQ ID Nº: 41), LEDL (SEQ ID Nº: 42), KEDA (SEQ ID Nº: 43), SEDC (SEQ ID Nº: 44), EEDD (SEQ ID Nº: 45), SEDK (SEQ ID Nº: 46), DEDD (SEQ ID Nº: 47), DEDG (SEQ ID Nº: 13), LEDE (SEQ ID Nº: 49), GEDA (SEQ ID Nº: 13), VEDF (SEQ ID Nº: 51), YEDE (SEQ ID Nº: 52), IEDL (SEQ ID Nº: 53), WEDY (SEQ ID Nº: 54), DEDW (SEQ ID Nº: 55), SEDL (SEQ ID Nº: 56), YEDQ (SEQ ID Nº: 57), LEDW (SEQ ID Nº: 58), YEDR (SEQ ID Nº: 59) e PEDK (SEQ ID Nº: 60).

[00027] Os anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno descritos neste pedido incluem aqueles que se ligam à proteína amiloide em

forma monomérica com uma afinidade de menos de aproximadamente 10^7 M^{-1} . Proteínas amiloides representativas incluem a proteína amiloide A sérica (SAA), proteína da cadeia leve da imunoglobulina (tal como $\text{V}\lambda 6 \text{ Wil}$ e $\text{V}\kappa$, polipeptídeo precursor amiloide de ilhota humana (IAPP), peptídeo amiloide beta, transtiretina (TTR) e ApoA1.

[00028] Também são fornecidos ácidos nucleicos isolados que codificam um anticorpo, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que se ligam especificamente a um epitopo compreendendo X_1EDX_2 em um agregado de proteína amiloide, em que X_1 e X_2 são qualquer aminoácido, incluindo todos tais anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno como descrito neste pedido acima e como apresentados nas reivindicações. Além disso são fornecidas células que expressam tais ácidos nucleicos.

[00029] A presente invenção fornece ainda métodos para tratar terapêuticamente ou tratar profilaticamente um indivíduo tendo amiloidose AA usando um anticorpo humano, humanizado ou quimérico, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que se liga especificamente a um epitopo nos resíduos 70 a 76 do peptídeo amiloide A humano, por exemplo, um epitopo nos resíduos 70 a 76 da SEQ ID Nº: 2. Indivíduos que podem beneficiar-se dos métodos terapêuticos revelados de tratamento da amiloidose AA incluem aqueles indivíduos que sofrem de uma doença amiloide selecionada a partir do grupo consistindo em artrite reumatoide, artrite crônica juvenil, espondilite anquilosante, psoríase, artropatia psoriática, síndrome de Reiter, doença de Still do Adulto, síndrome de Behcet, doença de Crohn, lepra, tuberculose, bronquiectasia, úlceras de decúbito, polinefrite crônica, osteomielite, doença de Whipple, linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas de intestino, pulmão e trato urogenital, carcinoma de célula basal, leucemia de célula cabeluda, Febre Mediterrânea Familiar e Doença de Castleman. Indivíduos que

podem beneficiar-se dos métodos profiláticos revelados incluem aqueles indivíduos suscetíveis a ou em risco de desenvolver alguma das desordens precedentes.

[00030] Também são fornecidos métodos para tratar terapêuticamente ou tratar profilaticamente um indivíduo tendo amiloidose associada com um agregado de proteína amiloide compreendendo a sequência de aminoácidos ED usando um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno que se liga especificamente a um epítipo compreendendo X_1EDX_2 em um agregado de proteína amiloide, em que X_1 e X_2 são qualquer aminoácido. Indivíduos que podem beneficiar-se dos métodos terapêuticos revelados de tratamento da amiloidose associada com um agregado de proteína amiloide incluem aqueles indivíduos sofrendo de amiloidose AA, amiloidose AL, mal de Alzheimer, Déficit Cognitivo Brando, polineuropatia amiloide, febre Mediterrânea, síndrome de Muckle-Wells, amiloidose sistêmica reativa associada com doenças inflamatórias sistêmicas, mieloma ou macroglobulinemia associada à amiloidose, amiloidose associada à discrasia de imunócito, gamopatia monoclonal, discrasia oculta, e amiloidose nodular local associada com doenças inflamatórias crônicas. Indivíduos que podem beneficiar-se dos métodos profiláticos revelados incluem aqueles indivíduos suscetíveis a ou em risco de desenvolver alguma das desordens precedentes. Em um aspecto da invenção, a proteína amiloide compreende a sequência AEDV (SEQ ID Nº: 23), e a doença amiloidogênica tratada terapêuticamente ou profilaticamente usando os métodos revelados é amiloidose AA, amiloidose AL, polineuropatia amiloide, febre Mediterrânea, síndrome de Muckle-Wells, amiloidose sistêmica reativa associada com doenças inflamatórias sistêmicas, mieloma ou macroglobulinemia associada com amiloidose, amiloidose associada com discrasia de imunócito, gamopatia monoclonal,

discrasia oculta, e amiloidose nodular local associada com doenças inflamatórias crônicas.

[00031] Os métodos terapêuticos e profiláticos revelados são úteis para tratar indivíduos humanos.

[00032] Índices representativos do tratamento terapêutico eficaz incluem a redução de velocidade da progressão de amiloidose, inibição da deposição de agregados amiloides fibrilares, e/ou depuração de agregados amiloides fibrilares. Índices representativos de tratamento profilático eficaz incluem retardo do início de um risco de amiloidose e/ou redução da amiloidose.

[00033] Ainda são fornecidos métodos de detecção de um depósito amiloide associado com amiloidose AA em um indivíduo com anticorpo humano, humanizado, ou quimérico, ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que se liga especificamente a um epitopo nos resíduos 70 a 76 do peptídeo amiloide A humano, anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno o qual está ligado a uma marcação detectável, e então detecção da marcação detectável no indivíduo. Os métodos adicionais compreendem a detecção de um agregado de proteína amiloide compreendendo a sequência de aminoácidos ED usando um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno que se liga especificamente a um epitopo compreendendo X_1EDX_2 em um agregado de proteína amiloide, em que X_1 e X_2 são qualquer aminoácido. Os métodos de detecção precedentes podem ser usados, por exemplo, para monitorar o início ou progressão da doença ou terapia em alguma das doenças e desordens acima observadas. Quanto aos métodos de tratamento revelados neste pedido, tal monitoramento pode ser realizado em humanos bem como indivíduos não humanos. Marcações detectáveis úteis incluem radiomarcações, tais como ^{125}I . Na execução de tais métodos de detecção, a etapa de detecção da marcação detectável pode ser realizada por técnicas não

invasivas, tais como visualização de SPECT/CT e espectroscopia por RMN. Ainda são fornecidos métodos de imunoterapia ativa de um indivíduo tendo amiloidose AA usando um agente que induz uma resposta imune a resíduos 70 a 76 do peptídeo amiloide A eficaz para induzir uma resposta imune compreendendo anticorpos contra resíduos 70 a 76 de um peptídeo amiloide A. Agentes representativos para induzir a resposta imune incluem resíduos 70 a 76 do peptídeo amiloide A ou um subfragmento de pelo menos 3 resíduos contíguos do mesmo tendo menos de 20 aminoácidos contíguos de um peptídeo AA. Estes métodos são úteis tanto terapeuticamente como profilaticamente para o tratamento dos indivíduos descritos neste pedido acima com respeito à imunoterapia passiva, isto é, pela administração de um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno que se liga especificamente a resíduos 70 a 76 do peptídeo amiloide A. Os índices de eficácia terapêutica e profilática também são como observados neste pedido acima com respeito à imunoterapia passiva.

[00034] O precedente resume aspectos particulares da invenção, e os aspectos adicionais da invenção são descritos neste pedido.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[00035] Figura 1: Alinhamento de sequência de SAA1 humana, SAA2 humano, SAA3 humana e SAA4 humana.

Figura 2: Alinhamento de sequência de SAA1 humana e AA1 humana.

Figura 3: Alinhamento de sequência de SAA2 humana e AA2 humana.

Figura 4: Alinhamento de sequência de SAA3 humana e AA3 humana.

Figura 5: Alinhamento de sequência de SAA4 humana e AA4 humana.

Figura 6: Alinhamento de sequência de AA1 humana, AA2

humana, AA3 humana e AA4 humana.

Figura 7: Alinhamento de sequência dos últimos sete resíduos de AA1 humana, AA2 hHumana, AA3 humana e AA4 humana.

Figura 8: Alinhamento de sequência de SAA1 de camundongo, SAA2 de camundongo, SAA3 de camundongo e SAA4 de camundongo.

Figura 9: Alinhamento de sequência de SAA1 de camundongo e AA1 de camundongo.

Figura 10: Alinhamento de sequência de SAA2 de camundongo e AA2 de camundongo.

Figura 11: Alinhamento de sequência de SAA3 de camundongo e AA3 de camundongo.

Figura 12: Alinhamento de sequência de SAA4 de camundongo e AA4 de cCamundongo.

Figura 13: Alinhamento de sequência de AA1 de camundongo, AA2 de camundongo, AA3 de camundongo, AA4 de camundongo.

Figura 14: Alinhamento de sequência dos últimos sete resíduos de AA1 de camundongo, AA2 de camundongo, AA3 de camundongo, AA4 de camundongo.

Figura 15: Alinhamento de sequência de SAA1 humana e SAA1 de camundongo.

Figura 16: Alinhamento de sequência de AA1 humana e AA1 de camundongo.

Figura 17: Alinhamento de sequência de SAA1 humana e Fragmento de SAA1 de camundongo.

Figura 18: Alinhamento de sequência SAA1 alfa humana, SAA1 beta humana e SAA1 gama humana.

Figura 19: Alinhamento de sequência de SAA2 alfa humana

e SAA2 beta humana.

Figura 20: Comparação de sequência de proteínas SAA. A região peptídica usada para gerar 2A4, 8G9 e 7D8 é mostrada em linhas tracejadas. A inserção de 8 aminoácidos entre as posições 67 e 68 na sequência de Shar Pei é indicada pelo sublinhado e flecha. O alinhamento executado com CLUSTALW.

Figura 21: Sequências de linhagem germinativa de cadeias leves Vk.

Figura 22: Sequências de linhagem germinativa de cadeias leves Vλ.

Figura 23: Sequência de aminoácidos de Vλ6 Wil.

Figura 24: Cristal de raio X de Vλ6 Wil mostrando posição de Glu50-Asp51.

Figura 25: Cristal de raio X de Vλ6 Wil mostrando posição de Glu81-Asp82

Figura 26: Cinética de ligação de mAbs Elan a fibrilas Vλ6 Wil sintéticas. Medidas de BIAcore da interação de mAbs 2A4, 7D8 e 8G9 em 6,6 nM a fibrilas Vλ6 Wil imobilizadas. O KD calculado de cada interação foi ~ 1 nM.

Figura 27: Cinética de ligação dependente da concentração de mAb 7D8 a fibrilas Vλ6 Wil sintéticas. A interação de anticorpo em uma concentração de 6,6 a 33,3 nM a fibrilas Vλ6 Wil imobilizadas foi medida por BIAcore.

Figura 28: Cinética de ligação de mAb 7D8 a fibrilas Vλ6 Wil sintéticas na presença dos peptídeos p39 e p41. A interação do mAb 7D8 em 6,6 nM com fibrilas Vλ6 Wil imobilizadas foi medida por BIAcore na presença de peptídeos p39 e p41 em 1 ou 20 µg/mL.

Figura 29: Reatividade de anticorpos monoclonais com depósitos amiloides teciduais ALλ.

Figura 30: Biodistribuição de mAb 7D8 marcado com ¹²⁵I

em camundongos carregando um amiloidoma AL λ humano.

Figura 31: Interação de anti-AA de sobrenadantes de cultura com fibrilas AA derivadas de murino. Resultados da ligação a AEF AA murina ao mAb dos sobrenadantes da cultura. Painéis superiores e inferiores são dados sobre a primeira e segunda coleta de fluido de cultura, respectivamente.

Figura 32: Análise por SDS-PAGE de mAbs 2A4, 8G9 e 7D8 purificados por proteína A.

Figura 33: Ligação de mAbs purificados ao peptídeo de imunização (p nº39) e controle (p nº41).

Figura 34: Ligação a extrato amiloide AA murino (AEF).

Figura 35: Ligação de mAbs purificados a extrato amiloide AA renal humano.

Figuras 36A-36E: Sequências das regiões variáveis da cadeia leve e cadeia pesada de 2A4, 7D8 e 8G9 murinos (figura 36A); sequências de regiões variáveis de cadeia leve de 2A4/8G9 e 7D8 humanizados (figuras 36B a 36C); sequências das regiões variáveis da cadeia leve humana usadas como regiões conservadas aceptoras (figura 36D); sequências de regiões variáveis da cadeia pesada de 2A4/7D8/8G9 humanizados e região variável da cadeia pesada humana usada como região conservada aceptora (figura 36E). Sublinhadas, CDRs; duplamente sublinhadas, sequências líder; minúsculas, retromutações.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[00036] A invenção fornece um anticorpo isolado ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que se liga especificamente a um epitopo incluindo X₁EDX₂ em um agregado de proteína amiloide, em que X₁ e X₂ são qualquer aminoácido.

[00037] Anticorpos representativos da invenção também incluem anticorpos ou fragmentos dos mesmos que (a) competem por ligação

a um epitopo incluindo X_1EDX_2 com um anticorpo 2A4, 7D8 ou 8G9; (b) ligam-se ao mesmo epitopo incluindo X_1EDX_2 como um anticorpo 2A4, 7D8 ou 8G9; (c) incluem um domínio de ligação a antígeno de um anticorpo 2A4, 7D8 ou 8G9; ou (d) incluem as seis regiões de determinação de complementaridade (CDRs) de um anticorpo 2A4, 7D8 ou 8G9.

[00038] A invenção também fornece uma região variável de anticorpo isolada incluindo (a) uma região variável da cadeia leve de um anticorpo derivado de um anticorpo 2A4, 7D8 ou 8G9; ou (b) uma região variável da cadeia pesada de um anticorpo derivado de um anticorpo 2A4, 7D8 ou 8G9.

[00039] A invenção também fornece um ácido nucleico isolado que codifica uma região variável da cadeia leve ou região variável da cadeia pesada de anticorpo incluindo (a) uma sequência nucleotídica que codifica uma região variável da cadeia leve ou cadeia pesada de um anticorpo 7D8, 2A4 ou 8G9; (b) uma sequência nucleotídica que é idêntica a uma sequência nucleotídica de um anticorpo 7D8, um 2A4, ou um 8G9 que codifica uma região variável da cadeia leve ou cadeia pesada; (c) uma sequência nucleotídica que é substancialmente idêntica a uma sequência nucleotídica de (a) ou (b); ou (d) um ácido nucleico que especificamente hibridiza a um ácido nucleico que tem uma sequência nucleotídica que é o complemento de uma sequência nucleotídica de (b) sob condições de hibridização estridentes.

[00040] Células expressando os anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno da presente invenção também são fornecidas. A invenção fornece ainda células expressando ácidos nucleicos da invenção.

[00041] A invenção também inclui métodos de tratamento de doenças amiloides e métodos de profilaxia de doenças amiloides usando os anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno da invenção. Atualmente, não há tratamentos direcionados para amiloide

específicos aprovados para nenhuma das doenças amiloides, incluindo Amiloidose AA e amiloidose AL. Ver Gillmore J.D. et al., *Lancet* 358:24-9 (2001). Onde há um estado de doença subjacente ou associado, terapia direcionada em direção à redução da produção da proteína amiloidogênica pelo tratamento da doença subjacente. Por exemplo, a estratégia de tratamento corrente para Amiloidose AA é visar a inflamação subjacente, reduzindo níveis de ApoSSA para abaixo de 10mg/l. Terapias correntemente empregadas incluem quimioterapia (clorambucil e MTX), imunossupressores (azatioprina), fármacos anti-inflamatórios (colchicina) e inibidores de TNF. A invenção fornece composições farmacêuticas e métodos para tratamento de diversas doenças amiloides, incluindo amiloidose, tal como, por exemplo, amiloidose AA e amiloidose AL. De acordo com um aspecto, a invenção inclui composições farmacêuticas que incluem, como um ingrediente ativo, um agente que é eficaz para induzir uma resposta imune em um paciente contra um componente amiloide. O agente pode ser um peptídeo compreendendo um fragmento consistindo da sequência de aminoácidos X_1EDX_2 derivado de uma proteína amiloide. O agente pode ser um anticorpo que se liga especificamente a um epítipo compreendendo X_1EDX_2 . Em outras modalidades, o agente pode ser um fragmento de ligação a antígeno de um anticorpo. Tais composições também incluirão geralmente excipientes e em modalidades preferenciais podem incluir adjuvantes. Em modalidades adicionais preferenciais, os adjuvantes incluem, por exemplo, hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio, MPL[®], QS-21 (STIMULON[®]) ou adjuvante de Freund incompleto. De acordo com uma modalidade relacionada, tais composições farmacêuticas podem incluir uma pluralidade de agentes eficazes para induzir uma resposta imune contra mais de um componente amiloide no paciente.

[00042] Em uma modalidade relacionada, o agente é eficaz para

produzir uma resposta imune direcionada contra um agregado de proteína amiloide, tal como um componente amiloide de peptídeo ou proteína fibrilar. Preferencialmente, tal peptídeo ou proteína fibrilar é derivado de uma proteína precursora fibrilar conhecida por ser associada com certas formas de doenças amiloides, como descrito neste pedido. Tais proteínas precursoras incluem, mas não são limitadas a, proteína Amiloide A Sérica (ApoSSA), cadeia leve da imunoglobulina, cadeia pesada de imunoglobulina, ApoAI, transtiretina, lisozima, cadeia α de fibrogênio, gelsolina, cistatina C, proteína precursora Amiloide β (β -APP), microglobulina Beta₂, proteína precursora de príon (PrP), fator natriurético atrial, queratina, polipeptídeo amiloide de ilhota, um hormônio peptídico e sinucleína. Tais precursores também incluem proteínas mutantes, fragmentos proteicos e peptídeos proteolíticos de tais precursores. Em uma modalidade preferencial, o agente é eficaz para induzir uma resposta imune direcionada contra um neoepitopo formado por uma proteína ou peptídeo fibrilar, com respeito a uma proteína precursora fibrilar. Isto é, como descrito em mais detalhes neste pedido, muitos peptídeos ou proteínas formadores de fibrila são fragmentos de tais proteínas precursoras, tais como aquelas listadas acima. Quando tais fragmentos são formados, tal como pela clivagem proteolítica podem ser revelados epitopos que não estão presentes no precursor e não estão, por isso, imunologicamente disponíveis para o sistema imune quando o fragmento é uma parte da proteína precursora. Agentes dirigidos a tais epitopos podem ser agentes terapêuticos preferenciais, uma vez que menos provavelmente podem induzir uma resposta autoimune no paciente. Preferencialmente, tais agentes preferencialmente produzem uma resposta imune direcionada contra uma forma patológica da proteína amiloide, por exemplo, um agregado de proteína amiloide, em relação a formas não patológicas da proteína

amiloide.

[00043] De acordo com uma modalidade relacionada, as composições farmacêuticas da invenção incluem agentes dirigidos a agregados amiloides, tais como aqueles selecionados a partir do grupo incluindo, mas não limitados aos seguintes peptídeos ou proteínas agregados (por exemplo, fibrila): fragmento AA, AL, ATTR, AApoA1, Alys, Agel, Acys, A β , AB₂M, AScr, Acal, AIAPP e sinucleína-NAC. Os nomes e composições completos destes peptídeos são descritos neste pedido. Tais peptídeos podem ser feitos de acordo com os métodos bem conhecidos na técnica, como descrito neste pedido.

[00044] Os métodos compreendem administração ao paciente de uma dosagem eficaz de um anticorpo que se liga especificamente a um epitopo compreendendo X₁EDX₂ em uma proteína amiloide, em que X₁ é H, T, F, S, P, A ou qualquer outro resíduo de aminoácido precedendo imediatamente ED em tal proteína amiloide; e em que X₂ é T, S, E, R, I, V, F, A ou qualquer outro resíduo de aminoácido imediatamente após ED em tal proteína amiloide. Em alguns métodos, o paciente está sofrendo de uma amiloidose associada com um agregado de proteína amiloide compreendendo sequência de aminoácidos ED. Alguns anticorpos se ligam especificamente a um epitopo consistindo em tal X₁EDX₂. Em alguns anticorpos, X₁ é H, T, F, S, P, ou A e X₂ é T, S, E, D, R, I, V, F ou A. Em alguns anticorpos, quando X₁ é H, X₂ é T ou A; quando X₁ é A, X₂ é S, T, E ou V; quando X₁ é T, X₂ é E; quando X₁ é F, X₂ é D; quando X₁ é S, X₂ é E, F ou A; e quando X₁ é P, X₂ é E, I ou F. Em alguns anticorpos, X₁ é H, T, F, S, P, ou A e X₂ é T, S, E, D, R, I, V, F ou A, com a ressalva que se X₁ for A, X₂ não é V. Em alguns anticorpos, quando X₁ é A, X₂ é S, T ou E.

[00045] Alguns anticorpos se ligam especificamente a um epitopo compreendendo a sequência de aminoácidos GHEDT, (SEQ ID N^o: 3), HEDT, (SEQ ID N^o: 12), AEDS, (SEQ ID N^o: 13), AEDT (SEQ ID N^o:

14), HEDA (SEQ ID Nº: 15), TEDE, (SEQ ID Nº: 16), FEDD, (SEQ ID Nº: 17), SEDE, (SEQ ID Nº: 18), AEDE, (SEQ ID Nº: 19), PEDE, (SEQ ID Nº: 20), PEDI, (SEQ ID Nº: 21), PEDF, (SEQ ID Nº: 22), AEDV, (SEQ ID Nº: 23), SEDF (SEQ ID Nº: 24) ou SEDA, (SEQ ID Nº: 25).

[00046] Alguns anticorpos se ligam especificamente a um peptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em GHEDT, (SEQ ID Nº: 3), HEDT, (SEQ ID Nº: 12), AEDS, (SEQ ID Nº: 13), AEDT, (SEQ ID Nº: 14), HEDA, (SEQ ID Nº: 15), TEDE, (SEQ ID Nº: 16), FEDD, (SEQ ID Nº: 17), SEDE, (SEQ ID Nº: 18), AEDE, (SEQ ID Nº: 19), PEDE, (SEQ ID Nº: 20), PEDI, (SEQ ID Nº: 21), PEDF, (SEQ ID Nº: 22), SEDF, (SEQ ID Nº: 24), e SEDA, (SEQ ID Nº: 25). Alguns anticorpos se ligam especificamente a um peptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em GHEDT, (SEQ ID Nº: 3), HEDT, (SEQ ID Nº: 12), AEDS, (SEQ ID Nº: 13), AEDT, (SEQ ID Nº: 14), HEDA, (SEQ ID Nº: 15), e TEDE, (SEQ ID Nº: 16).

[00047] Alguns anticorpos se ligam especificamente a um epitopo nos resíduos 70 a 76 de AA. Alguns anticorpos se ligam especificamente a um epitopo nos resíduos 71 a 75 de AA. Alguns anticorpos são construídos para um peptídeo compreendendo GHEDT, (SEQ ID Nº: 3).

[00048] Alguns anticorpos se ligam especificamente a um peptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos PEDS, (SEQ ID Nº: 26), PEDL, (SEQ ID Nº: 27), TEDV, (SEQ ID Nº: 28), AEDE, (SEQ ID Nº: 19), SEDI, (SEQ ID Nº: 29) e TEDT, (SEQ ID Nº: 30). Alguns anticorpos se ligam especificamente a um peptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos LEDG, (SEQ ID Nº: 31), AEDM, (SEQ ID Nº: 32), HEDS, (SEQ ID Nº: 33), CEDD, (SEQ ID Nº: 34), QEDS, (SEQ ID Nº: 35), REDS, (SEQ ID Nº: 36), TEDG, (SEQ ID Nº: 37), QEDR, (SEQ ID Nº: 38), TEDL, (SEQ ID Nº: 39), PEDN, (SEQ ID Nº: 40),

EEDP, (SEQ ID Nº: 41), LEDL, (SEQ ID Nº: 42), KEDA, (SEQ ID Nº: 43), SEDC, (SEQ ID Nº: 44), EEDD, (SEQ ID Nº: 45), SEDK, (SEQ ID Nº: 46), DEDD, (SEQ ID Nº: 47), DEDG, (SEQ ID Nº: 48), LEDE, (SEQ ID Nº: 49), GEDA, (SEQ ID Nº: 50), VEDF, (SEQ ID Nº: 51), YEDE, (SEQ ID Nº: 52), IEDL, (SEQ ID Nº: 53), WEDY, (SEQ ID Nº: 54), DEDW, (SEQ ID Nº: 55), SEDL, (SEQ ID Nº: 56), YEDQ, (SEQ ID Nº: 57), LEDW, (SEQ ID Nº: 58), YEDR, (SEQ ID Nº: 59) e PEDK, (SEQ ID Nº: 60).

[00049] Alguns anticorpos se ligam especificamente a um peptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos AEDV, (SEQ ID Nº: 23). Alguns anticorpos se ligam especificamente a um peptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos SEDF, (SEQ ID Nº: 24) ou PEDF, (SEQ ID Nº: 22). Alguns anticorpos se ligam especificamente a um peptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos AEDS, (SEQ ID Nº: 13). Alguns anticorpos se ligam especificamente a um peptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos PEDI (SEQ ID Nº: 21), AEDV, (SEQ ID Nº: 23), SEDF, (SEQ ID Nº: 24), SEDA, (SEQ ID Nº: 25), SEDE, (SEQ ID Nº: 18), AEDE, (SEQ ID Nº: 19) e PEDE, (SEQ ID Nº: 20). Alguns anticorpos ligam-se a um peptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos TEDE, (SEQ ID Nº: 16).

[00050] Alguns anticorpos se ligam especificamente a um peptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos AEDV, (SEQ ID Nº: 23). Alguns anticorpos se ligam especificamente a um peptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos SEDF, (SEQ ID Nº: 24) ou PEDF, (SEQ ID Nº: 22). Alguns anticorpos se ligam especificamente a um peptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos AEDS, (SEQ ID Nº: 13). Alguns anticorpos se ligam especificamente a um peptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos PEDI (SEQ ID Nº: 21), AEDV, (SEQ ID Nº: 23), SEDF,

(SEQ ID Nº: 24), SEDA, (SEQ ID Nº: 25), SEDE, (SEQ ID Nº: 18), AEDE, (SEQ ID Nº: 19) e PEDE, (SEQ ID Nº: 20). Alguns anticorpos ligam-se a um peptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos TEDE, (SEQ ID Nº: 16).

[00051] Qualquer um dos anticorpos descritos acima pode ser administrado nos métodos descritos acima para tratar ou efetuar profilaxia de uma doença caracterizada pela deposição de uma proteína amiloide, tal como, por exemplo, uma proteína amiloide compreendendo a sequência de aminoácidos ED. Em alguns métodos, se a proteína amiloide compreende a sequência de aminoácidos AEDV, (SEQ ID Nº: 23), então o anticorpo não é administrado para tratar ou efetuar profilaxia de mal de Alzheimer ou Déficit Cognitivo Brando. A proteína amiloide pode ser qualquer uma de proteína A amiloide sérica, proteína da cadeia leve da imunoglobulina, tal como, por exemplo, V λ 6 Wil ou V κ , polipeptídeo precursor de amiloide de ilhota humana (IAPP), peptídeo amiloide beta, transtiretina (TTR) ou ApoA1.

[00052] Opcionalmente, o paciente é humano. Opcionalmente, o anticorpo se liga especificamente a um peptídeo cujos resíduos consistem das SEQ ID N^{os} 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11. Opcionalmente, o anticorpo se liga especificamente a um epitopo nos resíduos 70 a 76 da (SEQ ID Nº: 2). Opcionalmente, o anticorpo é um anticorpo humano, anticorpo humanizado ou anticorpo quimérico. Opcionalmente, o anticorpo humano é do isotipo humano IgG1, IgG4, IgG2 ou IgG3. Opcionalmente, o anticorpo humanizado é do isotipo humano IgG1, IgG4, IgG2 ou IgG3. Opcionalmente, o anticorpo quimérico é do isotipo humano IgG1, IgG4, IgG2 ou IgG3. Opcionalmente, o anticorpo é um anticorpo de camundongo. Opcionalmente, o anticorpo é um anticorpo policlonal. Opcionalmente, o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

[00053] Em alguns métodos de tratamento, o anticorpo compreende duas cópias do mesmo par de cadeias leves e pesadas. Em outros métodos, o anticorpo é um anticorpo biespecífico compreendendo um primeiro par da cadeia leve e pesada que se liga especificamente ao epítipo de A β e um segundo par da cadeia leve e pesada que se liga especificamente a um receptor de Fc em células microgliais. Em outros métodos, uma cadeia do anticorpo é fusionada a um polipeptídeo heterólogo.

[00054] Alguns métodos de tratamento, a dosagem do anticorpo é pelo menos 1 mg/kg de peso corporal do paciente. Em outros métodos, a dosagem do anticorpo é pelo menos 10 mg/kg de peso corporal do paciente.

[00055] Em alguns métodos, de tratamento, o anticorpo é administrado com um veículo como uma composição farmacêutica. Em outros métodos, em que o anticorpo é um anticorpo humano para AA preparado a partir de células B de um humano imunizado com um peptídeo AA. Opcionalmente, o humano imunizado com peptídeo AA é o paciente. Em alguns métodos, o anticorpo é administrado intraperitonealmente, oralmente, intranasalmente, subcutaneamente, intramuscularmente, topicamente ou intravenosamente.

[00056] Em alguns métodos de tratamento, o anticorpo é administrado pela administração de um polinucleotídeo que codifica pelo menos uma cadeia de anticorpo ao paciente e o polinucleotídeo é expresso para produzir a cadeia de anticorpo no paciente. Opcionalmente, o polinucleotídeo codifica cadeias pesadas e leves do anticorpo e o polinucleotídeo é expresso para produzir as cadeias pesadas e leves no paciente.

[00057] Alguns métodos de tratamento acima compreendem ainda administração de uma dosagem eficaz de pelo menos um outro anticorpo que se liga a um epítipo diferente de AA. Alguns dos

métodos de tratamento acima compreendem ainda monitoramento do paciente para o nível do anticorpo administrado no sangue do paciente. Em outros métodos, o anticorpo é administrado em múltiplas dosagens por um período de pelo menos seis meses. Em outros métodos, o anticorpo é administrado como uma composição de liberação sustentada.

[00058] A invenção fornece ainda métodos de efetuar profilaxia da amiloidose AA em um paciente suscetível à amiloidose AA. Os métodos compreendem administração ao paciente de uma dosagem eficaz de um anticorpo que se liga especificamente a um epítipo nos resíduos 70 a 76 de AA. Opcionalmente, o paciente é humano. Opcionalmente, o anticorpo se liga especificamente a um peptídeo cujos resíduos consistem das SEQ ID N^{os} 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11. Opcionalmente, o anticorpo se liga especificamente a um epítipo nos resíduos 70 a 76 da (SEQ ID N^o: 2). Em alguns métodos, o paciente sofre de uma doença amiloide subjacente selecionada a partir do grupo consistindo em artrite reumatoide, artrite crônica juvenil, espondilite anquilosante, psoríase, artropatia psoriática, síndrome de Reiter, doença de Still do Adulto, síndrome de Behcet, doença de Crohn, lepra, tuberculose, bronquiectasia, úlceras de decúbito, polinefrite crônica, osteomielite, doença de Whipple, linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas de intestino, pulmão e trato urogenital, carcinoma de célula basal, leucemia de célula cabeluda, Febre Mediterrânea Familiar e Doença de Castleman.

[00059] A invenção fornece ainda um anticorpo humano, humanizado, ou quimérico que se liga especificamente a um epítipo nos resíduos 70 a 76 de AA. Opcionalmente, o anticorpo humanizado se liga especificamente a um epítipo nos resíduos 70 a 76 de AA. Opcionalmente, o anticorpo humanizado é uma versão humanizada do anticorpo 7D8 (Número de Acesso no ATCC _____).

Opcionalmente, o anticorpo humanizado é versão humanizada do anticorpo 7D29. Opcionalmente, o anticorpo humanizado é versão humanizada do anticorpo 7D19. Opcionalmente, o anticorpo humanizado é versão humanizada do anticorpo 7D47. Opcionalmente, o anticorpo humanizado é versão humanizada do anticorpo 7D39. Opcionalmente, o anticorpo humanizado é versão humanizada do anticorpo 7D66. Opcionalmente, o anticorpo humanizado é versão humanizada do anticorpo 8G9. Opcionalmente, o anticorpo humanizado é versão humanizada do anticorpo 8G3. Opcionalmente, o anticorpo humanizado é versão humanizada do anticorpo 8G4. Opcionalmente, o anticorpo humanizado é versão humanizada do anticorpo 8G51. Opcionalmente, o anticorpo humanizado é versão humanizada do anticorpo 8G22. Opcionalmente, o anticorpo humanizado é versão humanizada do anticorpo 8G30 humanizado. Opcionalmente, o anticorpo humanizado é versão humanizada do anticorpo 8G46. Opcionalmente, o anticorpo humanizado é versão humanizada do anticorpo 2A4 (Número de Acesso no ATCC _____). Opcionalmente, o anticorpo humanizado é versão humanizada do anticorpo 2A20. Opcionalmente, o anticorpo humanizado é versão humanizada do anticorpo 2A44. Opcionalmente, o anticorpo humanizado é versão humanizada do anticorpo 2A77. Opcionalmente, o anticorpo humanizado é versão humanizada do anticorpo 2A13. Opcionalmente, o anticorpo humanizado é versão humanizada do anticorpo 2A14.

[00060] A invenção fornece ainda composições farmacêuticas. As composições farmacêuticas compreendem um anticorpo que se liga especificamente a um epítipo nos resíduos 70 a 76 de AA, e um veículo farmacêuticamente aceitável. Algumas composições farmacêuticas compreendem um anticorpo humano, humanizado, ou quimérico que se liga especificamente a um epítipo nos resíduos 70 a

76 de AA, e um veículo farmaceuticamente aceitável. Outras composições farmacêuticas compreendem um anticorpo que se liga especificamente a um epítipo nos resíduos 70 a 76 de AA e um veículo farmaceuticamente aceitável, onde o isotipo do anticorpo é IgG1 humano, e um veículo farmaceuticamente aceitável. Em algumas composições farmacêuticas, o isotipo do anticorpo é IgG2, IgG3 ou IgG4 humano. Em algumas composições farmacêuticas, o anticorpo é humano. Em algumas composições farmacêuticas, o anticorpo é humanizado. Em algumas composições farmacêuticas, o anticorpo é quimérico. Em algumas composições farmacêuticas, o anticorpo é um anticorpo policlonal. Em algumas composições farmacêuticas, o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

[00061] Em algumas composições farmacêuticas, o anticorpo compreende duas cópias do mesmo par de cadeias leves e pesadas. Em algumas composições farmacêuticas, o anticorpo é um anticorpo biespecífico compreendendo um primeiro par da cadeia leve e pesada que se liga especificamente ao epítipo de AA e um segundo par da cadeia leve e pesada que se liga especificamente a um receptor de Fc em células microgliais. Em algumas composições farmacêuticas, uma cadeia do anticorpo é fusionada a um polipeptídeo heterólogo. Em algumas composições farmacêuticas, o veículo é um diluente fisiologicamente aceitável para administração parenteral. Algumas composições farmacêuticas são adaptadas para serem administradas intraperitonalmente, oralmente, intranasalmente, subcutaneamente, intramuscularmente, topicamente ou intravenosamente. Algumas composições farmacêuticas são adaptadas para serem administradas em múltiplas dosagens por um período de pelo menos seis meses. Algumas composições farmacêuticas são adaptadas para serem administradas como uma composição de liberação sustentada. Algumas composições farmacêuticas compreendem ainda pelo menos

um outro anticorpo que se liga a um epítipo diferente de AA.

[00062] A invenção fornece métodos de tratamento de amiloidose AA em um paciente. Os métodos compreendem administração de um agente que induz uma resposta imune a AA70-76 em um regime eficaz para induzir uma resposta imune compreendendo anticorpos contra AA70-76 em um regime eficaz para induzir uma resposta imune compreendendo anticorpos contra AA70-76. Em alguns métodos, o paciente é humano. Opcionalmente, o agente compreende AA70-76 ou um subfragmento de pelo menos 3 resíduos contíguos do mesmo e tem menos de 20 aminoácidos contíguos de um peptídeo AA. Opcionalmente, o agente é um peptídeo tendo uma sequência selecionada a partir do grupo consistindo das SEQ ID N^{os} 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 e subfragmentos de pelo menos 3 resíduos contíguos do mesmo e têm menos de 20 aminoácidos de um peptídeo AA. Opcionalmente, o agente é ligado em seus N e C terminais ao primeiro e segundo polipeptídeos heterólogos. Opcionalmente, o agente é ligado em seu N terminal a um polipeptídeo heterólogo, e em seu C-terminal a pelo menos uma cópia adicional do segmento N-terminal. Em alguns métodos, o polipeptídeo heterólogo induz uma resposta de célula T contra o polipeptídeo heterólogo e por meio disso uma resposta de célula B contra AA. Em alguns métodos, o polipeptídeo compreende ainda pelo menos uma cópia adicional de AA. Opcionalmente, o polipeptídeo compreende do N-terminal ao C-terminal, AA, uma pluralidade de cópias adicionais de AA, e o segmento de aminoácido heterólogo.

[00063] Em alguns métodos de tratamento, o polipeptídeo é administrado com um adjuvante que aumenta uma resposta imune para o segmento N-terminal. Opcionalmente, o adjuvante e o polipeptídeo são administrados em conjunto como uma composição. Opcionalmente, o adjuvante é administrado antes do polipeptídeo.

Opcionalmente, o adjuvante é administrado após o polipeptídeo. Em alguns métodos, o adjuvante é alúmen. Em alguns métodos, o adjuvante é MPL. Em alguns métodos, o adjuvante é QS-21. Em alguns métodos, o adjuvante é o adjuvante de Freund incompleto. Em alguns métodos, a resposta imune compreende células T que se ligam ao peptídeo AA como um componente de um complexo MHC I ou MHC II.

[00064] A invenção fornece métodos de efetuar profilaxia de amiloidose AA em um paciente. Os métodos compreendem administração de um agente que induz uma resposta imune a AA70-76 em um regime eficaz para induzir uma resposta imune compreendendo anticorpos contra AA70-76 em um regime eficaz para induzir uma resposta imune compreendendo anticorpos contra AA70-76. Em alguns métodos, o paciente é humano. Em alguns métodos, o paciente é assintomático. Em alguns métodos, o paciente sofre de uma doença amiloide subjacente selecionada a partir do grupo consistindo em artrite reumatoide, artrite crônica juvenil, espondilite anquilosante, psoríase, artropatia psoriática, síndrome de Reiter, doença de Still do Adulto, síndrome de Behcet, doença de Crohn, lepra, tuberculose, bronquiectasia, úlceras de decúbito, polinefrite crônica, osteomielite, doença de Whipple, linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas de intestino, pulmão e trato urogenital, carcinoma de célula basal, leucemia de célula cabeluda, Febre Mediterrânea Familiar e Doença de Castleman.

[00065] Em alguns métodos de efetuar profilaxia, o agente compreende AA70-76 ou um subfragmento de pelo menos 3 resíduos contíguos do mesmo e tem menos de 20 aminoácidos contíguos de um peptídeo AA. Opcionalmente, o agente é um peptídeo tendo uma sequência selecionada a partir do grupo consistindo das SEQ ID N^{os} 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 e subfragmentos de pelo menos 3 resíduos

contíguos do mesmo e têm menos de 20 aminoácidos de um peptídeo AA. Opcionalmente, o agente é ligado em seus N e C terminais ao primeiro e segundo polipeptídeos heterólogos. Opcionalmente, o agente é ligado em seu terminal N a um polipeptídeo heterólogo, e em seu C-terminal a pelo menos uma cópia adicional do segmento N-terminal. Em alguns métodos, o polipeptídeo heterólogo induz uma resposta de célula T contra o polipeptídeo heterólogo e por meio disso uma resposta de célula B contra AA. Em alguns métodos, o polipeptídeo compreende ainda pelo menos uma cópia adicional de AA. Opcionalmente, o polipeptídeo compreende do N-terminal ao C-terminal, AA, uma pluralidade de cópias adicionais de AA, e o segmento de aminoácido heterólogo.

[00066] A invenção fornece ainda composições farmacêuticas. As composições farmacêuticas compreendem um fragmento AA consistindo em resíduos que começam no resíduo 70 de AA e terminam no resíduo 76 de AA. Opcionalmente, o fragmento AA é ligado em seu C-terminal a um polipeptídeo heterólogo. Opcionalmente, o fragmento AA é ligado em seu N-terminal a um polipeptídeo heterólogo. Opcionalmente, o fragmento AA é ligado em seus N e C terminais ao primeiro e segundo polipeptídeos heterólogos. Opcionalmente, o fragmento AA é ligado em seu N terminal a um polipeptídeo heterólogo, e em seu C-terminal a pelo menos uma cópia adicional do segmento N-terminal. Opcionalmente, o polipeptídeo compreende ainda pelo menos uma cópia adicional do segmento N-terminal. Opcionalmente, o polipeptídeo compreende do N-terminal ao C-terminal, AA, uma pluralidade de cópias adicionais do segmento N-terminal, e o segmento de aminoácido heterólogo. Em algumas composições farmacêuticas, o polipeptídeo heterólogo induz uma resposta de célula T contra o polipeptídeo heterólogo e por meio disso uma resposta de célula B contra o segmento N-terminal.

[00067] Algumas composições farmacêuticas compreendem ainda um adjuvante que aumenta uma resposta imune a AA. Opcionalmente, o adjuvante é alúmen. Opcionalmente, o adjuvante é MPL. Opcionalmente, o adjuvante é QS-21. Opcionalmente, o adjuvante é o adjuvante de Freund incompleto. Opcionalmente, o adjuvante compreende ainda GM-CSF. Opcionalmente, o adjuvante é M-CSF. Opcionalmente, a composição compreende mais do que 10 microgramas do polipeptídeo.

[00068] A invenção fornece métodos de tratamento de amiloidose AA em um paciente. Os métodos compreendem administração de um agente eficaz para induzir uma resposta imune contra um componente peptídico de um depósito amiloide no paciente e um agente diferente que trata uma doença subjacente, e por meio disso tratando amiloidose AA no paciente. Em alguns métodos, a doença subjacente é selecionada a partir do grupo consistindo em artrite reumatoide, artrite crônica juvenil, espondilite anquilosante, psoríase, artropatia psoriática, síndrome de Reiter, doença de Still do Adulto, síndrome de Behcet, doença de Crohn, lepra, tuberculose, bronquiectasia, úlceras de decúbito, polinefrite crônica, osteomielite, doença de Whipple, linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas de intestino, pulmão e trato urogenital, carcinoma de célula basal, leucemia de célula cabeluda, Febre Mediterrânea Familiar e Doença de Castleman.

[00069] A invenção fornece métodos de efetuar profilaxia de amiloidose AA em um paciente. Os métodos compreendem administração de um agente eficaz para induzir uma resposta imune contra um componente peptídico de um depósito amiloide no paciente e um agente diferente que trata uma doença subjacente, e por meio disso tratando amiloidose AA no paciente. Em alguns métodos, a doença subjacente é selecionada a partir do grupo consistindo em artrite reumatoide, artrite crônica juvenil, espondilite anquilosante,

psoríase, artropatia psoriática, síndrome de Reiter, doença de Still do Adulto, síndrome de Behcet, doença de Crohn, lepra, tuberculose, bronquiectasia, úlceras de decúbito, polinefrite crônica, osteomielite, doença de Whipple, linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas de intestino, pulmão e trato urogenital, carcinoma de célula basal, leucemia de célula cabeluda, Febre Mediterrânea Familiar e Doença de Castleman.

[00070] A invenção fornece métodos de rastreamento de um anticorpo para atividade no tratamento de um paciente tendo amiloidose AA. Os métodos compreendem contato do anticorpo com o peptídeo AA e determinação se o anticorpo especificamente se liga a AA, ligação específica fornecendo uma indicação que o anticorpo tem atividade no tratamento de amiloidose AA.

[00071] A invenção fornece métodos de rastreamento de um anticorpo para atividade na depuração de uma entidade biológica fisicamente associada com um antígeno. Os métodos compreendem a combinação da entidade biológica associada a antígeno, o anticorpo e células fagocíticas carregando receptores de Fc em um meio; e monitoramento da quantidade da entidade biológica associada a antígeno que permanece no meio, uma redução da quantidade da entidade biológica associada a antígeno indicando que o anticorpo tem atividade de depuração contra o antígeno. Em alguns métodos, a etapa de monitoramento monitora a quantidade do antígeno que permanece no meio. Em alguns métodos, a combinação compreende adição da entidade biológica associada a antígeno ao meio, e contato do meio com as células fagocíticas carregando receptores de Fc. Em alguns métodos, a entidade biológica associada a antígeno é fornecida como uma amostra tecidual. Em alguns métodos, o antígeno é a entidade biológica. Em alguns métodos, a amostra tecidual compreende um depósito amiloide. Opcionalmente, a amostra tecidual

é do paciente ou um mamífero tendo patologia Amiloidose AA. Em alguns métodos, o antígeno é AA. Em alguns métodos, as células fagocíticas são células microgliais. Em alguns métodos, a amostra tecidual é selecionada a partir do grupo consistindo em uma amostra tecidual cancerosa, uma amostra tecidual viralmente infectada, uma amostra tecidual compreendendo células inflamatórias, um crescimento celular anormal não maligno, e uma amostra tecidual compreendendo uma matriz extracelular anormal.

[00072] A invenção fornece métodos de detecção de um depósito amiloide em um paciente. Os métodos compreendem administração ao paciente de um anticorpo que se liga especificamente a um epitopo nos aminoácidos 70 a 76 de AA e a detecção da presença do anticorpo no paciente. Opcionalmente, o anticorpo é marcado. Opcionalmente, o anticorpo é marcado com uma marcação paramagnética. Opcionalmente, o anticorpo marcado é detectado pela ressonância magnética nuclear. Opcionalmente, o anticorpo marcado é detectado com visualização SPECT/CT. Em alguns métodos, o anticorpo não tem capacidade de induzir uma resposta de depuração na ligação a um depósito amiloide no paciente.

[00073] A invenção fornece conjuntos diagnósticos. Os conjuntos compreendem um anticorpo que se liga especificamente a um epitopo com resíduos 70 a 76 de AA. Alguns conjuntos adicionais compreendem uso de marcações descritas do anticorpo para diagnóstico ou monitoramento *in vivo* de uma doença associada com depósitos amiloides de AA em um paciente. Em algumas modalidades, os conjuntos incluem instruções de uso do anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo na detecção de AA.

[00074] A invenção fornece ainda um método de diagnóstico de amiloidose em um indivíduo compreendendo: (a) administração ao indivíduo de um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do

mesmo que está ligado a uma marcação detectável, em que o anticorpo ou fragmento do mesmo se liga especificamente a um epitopo compreendendo X_1EDX_2 em um agregado de proteína amiloide, em que X_1 e X_2 são qualquer aminoácido; e (b) detecção da presença ou ausência do anticorpo ou fragmento ligado do mesmo, em que a presença do anticorpo ou fragmento ligado indica um diagnóstico de amiloidose AA.

[00075] Ainda é fornecido neste pedido um método de tratamento ou profilaxia de amiloidose usando um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que se liga especificamente a um epitopo compreendendo X_1EDX_2 em um agregado de proteína amiloide, em que X_1 e X_2 são qualquer aminoácido.

[00076] A presente invenção fornece um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo que se liga especificamente a um epitopo compreendendo X_1EDX_2 , em um agregado de proteína amiloide, em que X_1 e X_2 são qualquer aminoácido. Por exemplo, X_1 inclui H, T, F, S, P, A, L, C, Q, R, E, K, D, G, V, Y, I ou W, tal como H, T, F, S, P, ou A, ou, tal como H, T, F, ou A. X_2 inclui T, S, E, R, I, V, F, D, A, G, M, L, N, P, C, K, Y ou Q, tal como T, S, E, R, I, V, F, D ou A, ou, tal como T, S, E, D ou A. Em outros exemplos, X_1 é H, T ou A e X_2 é T, S, E ou A, tal como X_1 é H ou A e X_2 é T, S ou A. Em exemplos ainda adicionais, X_1 é H e X_2 é T ou A; ou X_1 é A e X_2 é S, T, E, ou V, tal como X_1 é A e X_2 é S, T ou E, ou X_1 é T e X_2 é E, ou X_1 é F e X_2 é D, ou X_1 é S e X_2 é E, F ou A; ou X_1 é P e X_2 é E, I ou F.

[00077] Em particular, os epitopos incluem sequências de aminoácido, tais como aquelas apresentadas nas SEQ ID N^o: 3 a SEQ ID N^o: 25, tais como SEQ ID N^{os}: 3, 12, 13, 14, 15 e 16. Exemplos adicionais incluem SEQ ID N^{os}: 4, 5, 7, 8 e 9, tais como SEQ ID N^o: 4. Anticorpos da invenção que se ligam aos epitopos, tal como a SEQ ID N^o: 3, incluem os anticorpos 2A4, 7D8 e 8G9.

[00078] Os agregados de proteínas amiloides aos quais os anticorpos da invenção se ligam são proteínas não monoméricas. Tais agregados de proteínas amiloides incluem proteína amiloide A sérica (SAA), proteína da cadeia leve da imunoglobulina, polipeptídeo precursor amiloide de ilhota humana (IAPP), peptídeo amiloide beta, transtiretina (TTR) e ApoA1, tal como SAA.

[00079] A invenção fornece ainda anticorpos ou fragmentos de ligação a antígeno do mesmo que (a) competem por ligação a um epitopo que inclui X_1EDX_2 com um anticorpo 2A4, 7D8 ou 8G9; (b) ligam-se ao mesmo epitopo que inclui X_1EDX_2 que um anticorpo 2A4, 7D8 ou 8G9; (c) têm um domínio de ligação a antígeno de um anticorpo 2A4, 7D8 ou 8G9; ou (d) incluem as seis regiões de determinação de complementaridade (CDRs) de um anticorpo 2A4, 7D8 ou 8G9. A invenção também fornece versões quiméricas ou humanizadas de um anticorpo 2A4, 7D8 ou 8G9.

[00080] Anticorpos representativos, que se ligam especificamente a um epitopo que inclui X_1EDX_2 , também incluem anticorpos que têm pelo menos uma, duas ou três regiões de determinação de complementaridade (CDRs) de uma cadeia leve de um anticorpo 2A4, 7D8 ou 8G9. Os anticorpos da invenção, que se ligam especificamente a um epitopo que inclui X_1EDX_2 , também incluem anticorpos que têm pelo menos uma, duas ou três das CDRs de uma cadeia pesada de um anticorpo 2A4, 7D8 ou 8G9.

[00081] CDRs podem ser identificadas de acordo com métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, sistemas de numeração para identificar CDRs são de uso comum. A definição Kabat é baseada na variabilidade de sequência, e a definição Chothia é baseada na posição das regiões de alça estrutural. A definição AbM é um ajuste entre as abordagens de Chothia e Kabat. As CDRs da região variável da cadeia leve são limitadas pelos resíduos nas posições 24 e 34

(CDR1-L), 50 e 56 (CDR2-L), e 89 e 97 (CDR3-L) de acordo com algoritmo de Kabat, Chothia ou AbM. De acordo com a definição Kabat, as CDRs da região variável da cadeia pesada são delimitadas pelos resíduos nas posições 31 e 35B (CDR1-H), 50 e 65 (CDR2-H), e 95 e 102 (CDR3-H) (numeração de acordo com Kabat). De acordo com a definição de Chothia, as CDRs da região variável da cadeia pesada são delimitadas pelos resíduos nas posições 26 e 32 (CDR1-H), 52 e 56 (CDR2-H), e 95 e 102 (CDR3-H) (numeração de acordo com Chothia). De acordo com a definição AbM, as CDRs da região variável da cadeia pesada são limitadas pelos resíduos nas posições 26 e 35B (CDR1-H), 50 e 58 (CDR2-H), e 95 e 102 (CDR3-H) (numeração de acordo com Kabat). Ver Martin et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9268-9272; Martin et al. (1991) *Methods Enzymol.* 203: 121-153; Pedersen et al. (1992) *Immunomethods* 1: 126; e Rees et al. (1996) em Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, pp. 141-172.

[00082] Os anticorpos da invenção incluem ainda um anticorpo que se liga especificamente a um epítipo compreendendo X_1EDX_2 , em um agregado de proteína amiloide, em que X_1 e X_2 são qualquer aminoácido, tendo regiões variáveis derivadas de regiões variáveis de um anticorpo 2A4, 7D8 ou 8G9. Anticorpos tendo regiões variáveis de anticorpos 2A4, 7D8 ou 8G9 também são incluídos.

[00083] Os anticorpos da invenção incluem ainda anticorpos quiméricos, anticorpos humanos, anticorpos humanizados, anticorpos de cadeia única, anticorpos tetraméricos, anticorpos tetravalentes, anticorpos multiespecíficos, anticorpos domínio-específicos, anticorpos domínio-deletados ou proteínas de fusão.

[00084] Fragmentos dos anticorpos da invenção também são fornecidos. Os fragmentos da invenção podem ser fragmentos Fab, fragmento Fab', fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos Fv ou fragmentos

ScFv. Tais anticorpos ou fragmentos dos mesmos podem ser ligados com um agente citotóxico, um agente radioterápico ou uma marcação detectável.

[00085] A invenção também fornece uma região variável de anticorpo isolada compreendendo (a) uma região variável da cadeia leve derivada de uma região variável da cadeia leve de anticorpo 7D8, 2A4 ou 8G9, ou (b) uma região variável da cadeia pesada derivada de uma região variável da cadeia leve de anticorpo 7D8, 2A4, ou 8G9. As regiões variáveis isoladas também são fornecidas tendo uma região variável da cadeia leve ou cadeia pesada de um anticorpo 7D8, 2A4 ou 8G9. As regiões variáveis de anticorpo isoladas são úteis na produção de anticorpo.

[00086] A invenção também fornece ácidos nucleicos isolados que codificam uma região variável da cadeia leve de anticorpo ou uma região variável da cadeia pesada tendo (a) uma sequência nucleotídica que codifica uma região variável da cadeia leve ou cadeia pesada de um anticorpo 7D8, 2A4 ou 8G9; (b) uma sequência nucleotídica que é idêntica a uma sequência nucleotídica de um anticorpo 7D8, um 2A4 ou um 8G9 que codifica uma região variável da cadeia leve ou pesada; ou (c) uma sequência nucleotídica que é substancialmente idêntica, isto é, pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, ou 99% a uma sequência nucleotídica de (a) ou (b); ou (d) um ácido nucleico que especificamente hibridiza a um ácido nucleico tendo uma sequência nucleotídica que é o complemento de uma sequência nucleotídica de (a) ou (b) sob condições de hibridização estringentes, por exemplo, condições finais de lavagem de SSC 0,1x a 65°C.

[00087] A presente invenção fornece ainda células e linhagens celulares expressando os anticorpos ou ácidos nucleicos da invenção.

Células hospedeiras representativas incluem células mamíferas e humanas, tais como células CHO, células HEK-293, células HeLa, células CV-1 e células COS. Métodos para geração de uma linhagem celular estável após transformação de um construto heterólogo em uma célula hospedeira são conhecidos na técnica. Células hospedeiras não mamíferas representativas incluem células de inseto (Potter et al. (1993) *Int. Rev. Immunol.* 10 (2-3):103-112). Anticorpos também podem ser produzidos em animais transgênicos (Houdebine (2002) *Curr. Opin. Biotechnol.* 13 (6):625-629) e plantas transgênicas (Schillberg et al. (2003) *Cell Mol. Life. Sci.* 60 (3):433-45).

[00088] A invenção também fornece métodos de tratamento ou efetuação de profilaxia de amiloidose associada usando fragmentos imunogênicos da proteína amiloide compreendendo X_1EDX_2 , em que X_1 é H, T, F, S, P, A ou qualquer outro resíduo de aminoácido imediatamente precedendo ED em tal proteína amiloide; e em que X_2 é T, S, E, R, I, V, F, A ou qualquer outro resíduo de aminoácido imediatamente após ED em tal proteína amiloide. Sem desejar estar ligado por uma teoria particular, acredita-se que um epitopo compreendendo X_1EDX_2 pode tornar-se exposto quando uma proteína amiloide agrega-se, ou sofre fibrilogênese ou de outra maneira introduz uma estrutura fibrilar, se pela clivagem de uma proteína precursora maior ou pela modificação conformacional. Por exemplo, métodos representativos de tratamento ou profilaxia de amiloidose AA incluem administração de fragmentos AA 70-76 ou fragmentos imunogênicos dos mesmos. A invenção também fornece métodos de tratamento ou efetuação de profilaxia de amiloidose associada com a deposição da proteína amiloide usando anticorpos reativos com X_1EDX_2 em um agregado de proteína amiloide, em que X_1 é H, T, F, S, P, A ou qualquer outro resíduo de aminoácido imediatamente precedendo ED em tal agregado de proteína amiloide; e em que X_2 é

T, S, E, R, I, V, F, A ou qualquer outro resíduo de aminoácido imediatamente após ED em tal agregado de proteína amiloide. Preferencialmente, tais anticorpos são preferencialmente reativos com agregado de proteína amiloide em relação à proteína amiloide não patológica. Por exemplo, métodos de tratamento ou profilaxia de amiloidose AA associada com fibrilas AA podem incluir administração de anticorpos específicos para a região C-terminal de fibrilas AA (~resíduos 70 a 76 de AA). Os anticorpos podem inibir a formação de agregados AA (por exemplo, fibrilas) ou resultam em sua desagregação e depuração dessa forma tratando ou efetuando profilaxia de amiloidose AA.

I. Definições

[00089] O termo "identidade substancial" significa que duas sequências peptídicas, quando alinhadas otimamente, tais como pelos programas GAP ou BESTFIT usando pesos de lacuna pré-configurados, compartilham identidade de sequência de pelo menos 65 por cento, preferencialmente identidade de sequência de pelo menos 80 ou 90 por cento, mais preferencialmente identidade de sequência de pelo menos 95 por cento ou mais (por exemplo, identidade de sequência de 99 por cento ou superior). Preferencialmente, as posições de resíduo, que não são idênticas diferenciam-se por substituições de aminoácido conservativas.

[00090] Para a comparação de sequência, tipicamente uma sequência atua como uma sequência de referência, a qual as sequências teste são comparadas. Usando um algoritmo de comparação de sequência, sequências teste e de referência são introduzidas em um computador, as coordenadas de subsequência são indicadas, se necessário, e os parâmetros de programa de algoritmo de sequência são indicados. O algoritmo de comparação de sequência então calcula a identidade de sequência percentual da

sequência(s) teste em relação à sequência de referência, com base nos parâmetros de programa indicados.

[00091] Alinhamento ótimo de sequências para comparação pode ser conduzido, por exemplo, pelo algoritmo de homologia local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), pelo algoritmo de alinhamento de homologia de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), pela método de busca de similaridade de Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), por implementações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no Pacote de Programa de Genética de Wisconsin, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), ou pela inspeção visual (*ver geralmente* Ausubel *et al.*, *supra*). Um exemplo de algoritmo que é adequado para determinar a identidade de sequência percentual e similaridade de sequência é o algoritmo BLAST, que é descrito em Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990). O programa para realizar análises por BLAST está publicamente disponível através de National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Tipicamente, os parâmetros de programa pré-configurados podem ser usados para realizar a comparação de sequência, embora os parâmetros construídos também possam ser usados. Para sequências de aminoácido, o programa BLASTP usa como um wordlength pré-configurado (W) de 3, uma expectativa (E) de 10, e a matriz de classificação BLOSUM62 (*ver* Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10915 (1989))

[00092] Para fins de classificação de substituições de aminoácidos como conservativas ou não conservativas, os aminoácidos são agrupados como se segue: Grupo I (cadeias laterais hidrofóbicas: norleucina, met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadeias laterais hidrofílicas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadeias laterais acídicas): asp, glu; Grupo IV (cadeias laterais básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V

(resíduos que influenciam na orientação da cadeia): gly, pro; e Grupo VI (cadeias laterais aromáticas): trp, tyr, phe. Substituições conservativas envolvem substituições entre aminoácidos na mesma classe. Substituições não conservativas constituem a troca de um membro de uma destas classes por um membro de outra.

[00093] O termo "todo-D" refere-se a peptídeos tendo $\geq 75\%$, $\geq 80\%$, $\geq 85\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$, e 100% de aminoácidos de configuração D.

[00094] O termo "agente" é usado para descrever um composto que tem ou pode ter uma atividade farmacológica. Os agentes incluem compostos que são fármacos conhecidos, compostos para os quais a atividade farmacológica foi identificada, mas que estão sofrendo avaliação terapêutica adicional, e compostos que são membros de coleções e bibliotecas que devem ser rastreadas para uma atividade farmacológica.

[00095] "Doença amiloide" ou "amiloidose" referem-se a qualquer número de desordens que tem como um sintoma ou como parte da sua patologia o acúmulo ou formação de placas amiloides. Uma "placa amiloide" é um depósito extracelular composto principalmente de fibrilas proteicas. Geralmente, as fibrilas são compostas de uma proteína ou peptídeo dominante; entretanto, a placa também pode incluir componentes adicionais que são moléculas peptídicas ou não peptídicas, como descrito neste pedido.

[00096] Uma "proteína amiloide" ou "peptídeo amiloide" é uma proteína ou peptídeo capaz de sofrer clivagem, modificação conformacional, agregação ou fibrilogênese, resultando na formação de oligômeros patológicos, fibrilas amiloides, placas amiloides e/ou componentes amiloides.

[00097] Um "componente amiloide" é qualquer entidade molecular que está presente em uma placa amiloide incluindo porções

antigênicas de tais moléculas. Componentes amiloides incluem, mas não são limitados a proteínas, peptídeos, proteoglicanos e carboidratos.

[00098] Um "agente antiamilóide" é um agente que é capaz de produzir uma resposta imune contra um componente de placa amiloide em um indivíduo vertebrado, quando administrado por técnicas de imunização ativas ou passivas.

[00099] Uma "proteína AA" ou "peptídeo AA" refere-se à forma da proteína ou peptídeo A de proteína amiloide formado pela clivagem proteolítica de proteína A amiloide sérica (SAA), se monomérica ou agregada, solúvel ou insolúvel.

[000100] Um "agregado de proteína amiloide" ou "agregado de peptídeo amiloide" ou "agregado amiloide" refere-se a uma forma agregada patológica, não monomérica de uma proteína amiloide ou peptídeo amiloide. Os agregados de proteínas amiloides e peptídeos amiloide podem ser solúveis ou insolúveis. Alguns agregados de proteínas amiloides e agregados de peptídeos amiloide podem formar oligômeros, fibrilas e/ou placas amiloides. Exemplos de tais agregados de proteínas amiloides e peptídeos amiloides, incluindo peptídeos e proteínas fibrilares são fornecidos neste pedido.

[000101] Um "agregado de AA" refere-se a uma forma agregada de AA.

[000102] Os agentes terapêuticos da invenção são tipicamente substancialmente puros do contaminante indesejado. Isto significa que um agente tem tipicamente pureza de pelo menos aproximadamente 50% p/p (peso/peso), bem como sendo substancialmente livre de proteínas e contaminantes interferentes. Às vezes, os agentes têm pureza pelo menos de aproximadamente 80% p/p e, mais preferencialmente pelo menos 90 ou aproximadamente 95% p/p. Entretanto, usando técnicas de purificação proteicas convencionais,

peptídeos homogêneos de pelo menos 99% p/p podem ser obtidos. Agentes terapêuticos da invenção podem impedir, efetuar profilaxia, ou tratar uma doença associada com depósitos amiloides.

[000103] Ligação específica entre duas entidades significa que as entidades têm uma afinidade mútua entre si que é pelo menos 10-, 100- ou 100 vezes maior do que afinidade de entidade por um controle, tal como antígeno não relacionado ou anticorpo para um antígeno diferente. A afinidade mútua das duas entidades entre si é normalmente pelo menos 10^7 M^{-1} , 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} , ou 10^{10} M^{-1} . Afinidades maiores do que 10^8 M^{-1} são preferenciais.

[000104] O termo "imunoglobulina" ou "anticorpo" (usado intercambiavelmente neste pedido) refere-se a uma proteína de ligação a antígeno tendo uma estrutura de cadeia de quatro polipeptídeos básicos consistindo em duas cadeias pesadas e duas leves, as ditas cadeias sendo estabilizadas, por exemplo, por ligações dissulfeto intercadeia, que tem a capacidade de ligar-se especificamente ao antígeno. Tanto as cadeias pesadas como leves são dobradas em domínios. O termo "domínio" refere-se a uma região globular de um polipeptídeo da cadeia pesada ou leve compreendendo alças peptídicas (por exemplo, compreendendo 3 a 4 alças peptídicas) estabilizadas, por exemplo, folha β dobrada e/ou ligação dissulfeto peptídicas intracadeia. Os domínios são referidos ainda neste pedido como "constantes" ou "variáveis", baseados na falta relativa da variação de sequência dentro dos domínios de vários membros de classe no caso de um domínio "constante", ou a variação significativa dentro dos domínios de vários membros de classe no caso de um domínio "variável". "Domínios constantes" na cadeia leve são referidos intercambiavelmente como "regiões constantes da cadeia leve", "domínios constantes da cadeia leve", regiões "CL" ou domínios "CL". Domínios "constantes" na cadeia pesada são referidos

intercambiavelmente como "regiões constantes da cadeia pesada", "domínios constantes da cadeia pesada", regiões "CH" ou domínios "CH". Domínios "variáveis" na cadeia leve são referidos intercambiavelmente como "regiões variáveis da cadeia leve", "domínios variáveis da cadeia leve", regiões "VL" ou domínios "VL". Domínios "variáveis" na cadeia pesada são referidos intercambiavelmente como "regiões constantes da cadeia pesada", "domínios constantes da cadeia pesada", regiões "CH" ou domínios "CH".

[000105] O termo "região" refere-se a uma parte ou porção de uma cadeia de anticorpo e inclui domínios constantes ou variáveis como definidos neste pedido, bem como partes ou porções mais discretas dos ditos domínios. Por exemplo, domínios ou regiões variáveis da cadeia leve incluem "regiões de determinação de complementaridade" ou "CDRs" entremeadas entre "regiões conservadas" ou "FRs", como definido neste pedido.

[000106] Imunoglobulinas ou anticorpos podem existir na forma monomérica ou polimérica. O termo "fragmento de ligação a antígeno" refere-se a um fragmento polipeptídico de uma imunoglobulina ou anticorpo que se liga ao antígeno ou compete com o anticorpo intacto (isto é, com o anticorpo intacto do qual foram derivados) pela ligação ao antígeno (*isto é*, ligação específica). O termo "conformação" refere-se à estrutura terciária de uma proteína ou polipeptídeo (*por exemplo*, um anticorpo, cadeia de anticorpo, domínio ou região do mesmo). Por exemplo, a frase "conformação da cadeia leve (ou pesada)" refere à estrutura terciária de uma região variável da cadeia leve (ou pesada), e a frase "conformação de anticorpo" ou "conformação de fragmento de anticorpo" refere-se à estrutura terciária de um anticorpo ou fragmento do mesmo.

[000107] "Ligação específica" de um anticorpo significa que o

anticorpo exibe afinidade apreciável pelo antígeno ou um epitopo preferencial e, preferencialmente, não exibe reatividade cruzada significativa. Ligação "apreciável" ou preferencial inclui ligação com uma afinidade de pelo menos 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 M^{-1} ou 10^{10} M^{-1} . Afinidades maiores do que 10^7 M^{-1} , preferencialmente maiores do que 10^8 M^{-1} são mais preferenciais. Valores intermediários daqueles apresentados neste pedido também são destinados a estar no escopo da presente invenção e uma afinidade de ligação preferencial pode ser indicada como uma faixa de afinidades, por exemplo, 10^6 a 10^{10} M^{-1} , preferencialmente 10^7 a 10^{10} M^{-1} , mais preferencialmente 10^8 a 10^{10} M^{-1} . Um anticorpo que "não exibe reatividade cruzada significativa" é aquele que não se ligará apreciavelmente a uma entidade indesejável (por exemplo, uma entidade proteica indesejável). Por exemplo, um anticorpo que se liga especificamente a AA se ligará apreciavelmente a AA, mas não reagirá significativamente com proteínas ou peptídeos não AA (por exemplo, proteínas ou peptídeos não AA incluídos em placas). Um anticorpo específico para um epitopo preferencial vai, por exemplo, não significativamente reagir cruzadamente com epitopos remotos na mesma proteína ou peptídeo. A ligação específica pode ser determinada de acordo com qualquer meio reconhecido na técnica para determinar tal ligação. Preferencialmente, a ligação específica é determinada de acordo com a análise Scatchard e/ou ensaios de ligação competitiva.

[000108] Fragmentos de anticorpo de ligação a antígeno são produzidos por técnicas de DNA recombinante, ou pela clivagem enzimática ou química de imunoglobulinas intactas. Fragmentos de ligação incluem Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv, cadeias únicas, e anticorpos de cadeia única. Fragmentos de anticorpo adicionais e variantes de função efetora são discutidos neste pedido na seção intitulada "Anticorpos". Além de imunoglobulinas ou anticorpos

"biespecíficas" ou "bifuncionais", uma imunoglobulina ou anticorpo é entendido ter cada um dos seus sítios de ligação idênticos. Um anticorpo "biespecífico" ou "bifuncional" é um anticorpo híbrido artificial que tem dois pares da cadeia pesada/leve diferentes e dois sítios de ligação diferentes. Anticorpos biespecíficos podem ser produzidos por uma variedade de métodos incluindo fusão de hibridomas ou ligação de fragmentos Fab'. Ver, *por exemplo*, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992).

[000109] O termo "imunoglobulina humanizada" ou "anticorpo humanizado" refere-se a uma imunoglobulina ou anticorpo que inclui pelo menos uma cadeia de imunoglobulina ou anticorpo humanizada (isto é, pelo menos uma cadeia leve ou pesada humanizada). O termo "cadeia de imunoglobulina humanizada" ou "cadeia de anticorpo humanizada" (isto é, uma "cadeia leve da imunoglobulina humanizada" ou "cadeia pesada de imunoglobulina humanizada") refere-se a uma cadeia de imunoglobulina ou anticorpo (isto é, uma cadeia leve ou pesada, respectivamente) tendo uma região variável que inclui uma região conservada variável substancialmente de uma imunoglobulina ou anticorpo humano e regiões de determinação de complementaridade (CDRs) (por exemplo, pelo menos uma CDR, preferencialmente duas CDRs, mais preferencialmente três CDRs) substancialmente de uma imunoglobulina ou anticorpo não humano, e além disso, inclui regiões constantes (*por exemplo*, pelo menos uma região constante ou porção da mesma, no caso de uma cadeia leve, e preferencialmente três regiões constantes no caso de uma cadeia pesada). O termo "região variável humanizada" (por exemplo, "região variável da cadeia leve humanizada" ou "região variável da cadeia pesada humanizada") refere-se a uma região variável que inclui uma região conservada variável substancialmente de uma imunoglobulina

ou anticorpo humano e regiões de determinação de complementaridade (CDRs) substancialmente de uma imunoglobulina ou anticorpo não humano.

[000110] A frase "substancialmente de uma imunoglobulina ou anticorpo humano" ou "substancialmente humano" significa que, quando alinhado a uma sequência amino de imunoglobulina ou anticorpo humano para fins de comparação, a região compartilha identidade de pelo menos 80 a 90%, preferencialmente 90 a 95%, mais preferencialmente de 95 a 99% (*isto é*, identidade de sequência local) com a região conservada humana ou sequência de região constante, permitindo, por exemplo, para substituições conservativas, substituições de sequência consenso, substituições de linhagem germinativa, retromutações e similares. A introdução de substituições conservativas, substituições de sequência consenso, substituições de linhagem germinativa, retromutações e similares, é muitas vezes referida como "otimização" de um anticorpo ou cadeia humanizada. A frase "substancialmente de uma imunoglobulina ou anticorpo não humano" ou "substancialmente não humano" significa ter uma imunoglobulina ou sequência de anticorpo pelo menos 80 a 95%, preferencialmente 90 a 95%, mais preferencialmente, 96%, 97%, 98%, ou 99% idênticos àquela de um organismo não humano, *por exemplo*, um mamífero não humano.

[000111] Consequentemente, todas regiões ou resíduos de uma imunoglobulina ou anticorpo humanizado, ou de uma cadeia de imunoglobulina ou anticorpo humanizado, exceto possivelmente as CDRs, são substancialmente idênticas às regiões ou resíduos correspondentes de uma ou mais sequências de imunoglobulina humana nativa. O termo "região correspondente" ou "resíduo correspondente" refere-se a uma região ou resíduo em um segundo aminoácido ou sequência nucleotídica que ocupa a mesma (*isto é*,

equivalente) posição como uma região ou resíduo em um primeiro aminoácido ou sequência nucleotídica, quando a primeira e segunda sequência são otimamente alinhadas para fins de comparação.

[000112] Os termos "imunoglobulina humanizada" ou "anticorpo humanizado" não são destinados a englobar imunoglobulinas ou anticorpos quiméricos, como definido *infra*. Embora as imunoglobulinas ou anticorpos humanizados sejam quiméricos em sua construção (isto é, compreende regiões de mais de uma espécie de proteína), incluem características adicionais (isto é, regiões variáveis compreendendo resíduos de CDR doadora e resíduos de região conservada aceptora) não encontradas em imunoglobulinas ou anticorpos quiméricos, como definido neste pedido.

[000113] O termo "imunoglobulina quimérica" ou anticorpo refere-se a uma imunoglobulina ou anticorpo cujas regiões variáveis derivam de uma primeira espécie e cujas regiões constantes derivam de uma segunda espécie. Imunoglobulinas ou anticorpos quiméricos podem ser construídos, por exemplo, pela engenharia genética, de segmentos gênicos de imunoglobulina pertencendo a espécies diferentes.

[000114] Um "antígeno" é uma entidade (por exemplo, uma entidade proteica ou peptídeo) ao qual um anticorpo especificamente se liga.

[000115] O termo "epitopo" ou "determinante antigênico" refere-se a um sítio em um antígeno ao qual uma imunoglobulina ou anticorpo (ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo) se ligam especificamente. Epitopos podem ser formados tanto de aminoácidos contíguos como aminoácidos não contíguos justapostos pelo enovelamento terciário de uma proteína. Epitopos formados de aminoácidos contíguos são tipicamente conservados na exposição a solventes desnaturantes ao passo que epitopos formados pelo enovelamento terciário são tipicamente perdidos no tratamento com solventes desnaturantes. Um epitopo tipicamente inclui pelo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,

14 ou 15 aminoácidos em uma conformação espacial única. Métodos de determinação da conformação espacial de epitopos incluem, por exemplo, cristalografia de raio x e ressonância magnética nuclear bidimensional. Ver, *por exemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, volume 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

[000116] Anticorpos representativos da invenção incluem um anticorpo ou fragmento do mesmo que se liga especificamente a um epitopo que inclui X_1EDX_2 em um agregado de proteína amiloide, que se liga ao epitopo incluindo X_1EDX_2 que também está ligado, por exemplo, por um anticorpo 2A4, 7D8 ou 8G9. Anticorpos que reconhecem o mesmo epitopo podem ser identificados em um imunoenensaio simples mostrando a capacidade de um anticorpo de bloquear a ligação de outro anticorpo a um antígeno-alvo, isto é, um ensaio de ligação competitiva. A ligação competitiva é determinada em um ensaio no qual a imunoglobulina no teste inibe a ligação específica de um anticorpo de referência a um antígeno comum, tal como A β . Numerosos tipos de ensaios de ligação competitiva são conhecidos, por exemplo: radioimunoensaio direto ou indireto em fase sólida (RIA), imunoenensaio de enzima direto ou indireto em fase sólida (EIA), ensaio de competição em sanduíche (ver Stahli *et al.*, *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); EIA de biotina-avidina direto em fase sólida (ver Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); ensaio de marcação direta em fase sólida, ensaio em sanduíche de marcação direta em fase sólida (ver Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA de marcação direta em fase sólida usando marcação com I-125 (ver Morel *et al.*, *Mol. Immunol.* 25 (1):7 (1988)); EIA direto biotina-avidina em fase sólida (Cheung *et al.*, *Virology* 176:546 (1990)); e RIA de marcação direta. (Moldenhauer *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)). Tipicamente, tal ensaio envolve o uso do antígeno purificado ligado a uma superfície sólida ou células

carregando qualquer destes, uma imunoglobulina teste não marcada e uma imunoglobulina de referência marcada. A inibição competitiva é medida pela determinação da quantidade de marcação ligada à superfície sólida ou células na presença da imunoglobulina teste. Normalmente a imunoglobulina teste está presente em excesso. Normalmente, quando um anticorpo competidor está presente em excesso, inibirá a ligação específica de um anticorpo de referência a um antígeno comum em pelo menos 50 a 55%, 55 a 60%, 60 a 65%, 65 a 70%, 70 a 75% ou mais.

[000117] Um epitopo também é reconhecido por células imunológicas, por exemplo, células B e/ou células T. O reconhecimento celular de um epitopo pode ser determinado por ensaios *in vitro* que medem a proliferação dependente do antígeno, como determinado pela incorporação de ³H-timidina, pela secreção de citocina, pela secreção de anticorpo, ou pela eliminação dependente de antígeno (ensaio de linfócito T citotóxico).

[000118] O termo "neoepitopo" refere-se a um novo e/ou único sítio em um antígeno no qual células B e/ou T respondem.

[000119] O termo "anticorpos de neoepitopo" refere-se a anticorpos que especificamente reconhecem uma nova sequência de aminoácidos de N- ou C-terminal exposta pela clivagem proteolítica de uma molécula, mas não se liga a tal epitopo na molécula (não clivada) nativa. O termo "anticorpos de neoepitopo" pode referir-se a anticorpos que especificamente reconhecem uma nova sequência de aminoácidos de N- ou C-terminal exposta pela clivagem proteolítica de SAA, mas não se ligam a tal epitopo na molécula SAA (não clivada) nativa. Alguns anticorpos de neoepitopo ligam-se a AA solúvel ou insolúvel e resultam na dissociação de agregados AA, incluindo fibrilas AA. Um "anticorpo de neoepitopo" também pode ser um anticorpo que especificamente reconhece um novo epitopo que está somente

disponível para ligar-se a um anticorpo após uma proteína sofrer uma modificação de conformação, por exemplo, como no caso de amiloidose AL e cadeia leve, quando somente a cadeia leve é expressa e forma o amiloide. O termo "imunológico" ou resposta "imune" é o desenvolvimento de uma resposta humoral benéfica (mediada por anticorpo) e/ou uma celular (mediada por células T específicas para o antígeno ou seus produtos de secreção) direcionada contra um peptídeo amiloide em um paciente recipiente. Tal resposta pode ser uma resposta ativa induzida pela administração de imunógeno ou uma resposta passiva induzida pela administração de anticorpo ou células T preparadas. Uma resposta imune celular é obtida pela apresentação de epitopos polipeptídicos em associação com moléculas MHC Classe I ou Classe II para ativar células T auxiliares CD4⁺ e/ou células T citotóxicas CD8⁺ antígeno-específicas. A resposta também pode envolver a ativação de monócitos, macrófagos, células NK, basófilos, células dendríticas, astrócitos, células microgliais, eosinófilos ou outros componentes de imunidade inata. A presença de uma resposta imunológica mediada por célula pode ser determinada por ensaios de proliferação (células T CD4⁺) ou ensaios de CTL (linfócito T citotóxico) (ver Burke, *supra*; Tigges, *supra*). As contribuições relativas de respostas celulares e humorais ao efeito protetor ou terapêutico de um imunógeno podem ser distinguidas isolando separadamente anticorpos e células T de um animal singeneico imunizado e medindo efeito protetor ou terapêutico em um segundo indivíduo.

[000120] Um "agente imunogênico" ou "imunógeno" é capaz de induzir uma resposta imunológica contra si mesmo na administração a um mamífero, opcionalmente em conjunto com um adjuvante.

[000121] O termo "polinucleotídeo nu" refere-se a um polinucleotídeo não complexado com materiais coloidais. Polinucleotídeos nus são às

vezes clonados em um vetor plasmidial.

[000122] O termo "adjuvante" refere-se a um composto que quando administrado em conjunto com um antígeno aumenta a resposta imune ao antígeno, mas quando administrado sozinho não gera uma resposta imune ao antígeno. Os adjuvantes podem aumentar uma resposta imune por vários mecanismos incluindo recrutamento de linfócito, estimulação de células B e/ou T, e estimulação de macrófagos.

[000123] O termo "dose eficaz" ou "dosagem eficaz" é definido como uma quantidade suficiente para alcançar ou pelo menos parcialmente alcançar o efeito desejado. O termo "dose terapeuticamente eficaz" é definido como uma quantidade suficiente para curar ou pelo menos parcialmente deter a doença e suas complicações em um paciente que já sofre da doença. Quantidades eficazes para este uso dependerão da severidade da infecção e o estado geral do sistema imune do próprio paciente.

[000124] O termo "paciente" inclui indivíduos mamíferos humanos e outros que recebem o tratamento profilático ou terapêutico.

[000125] A invenção fornece anticorpos ou fragmentos de ligação a antígeno do mesmo que se ligam especificamente a um epitopo que inclui X₁EDX₂ em um agregado de proteína amiloide, e que compete pela ligação ao epitopo compreendendo X₁EDX₂ com, por exemplo, um anticorpo 2A4, 7D8 ou 8G9. A competição entre anticorpos é determinada por um ensaio no qual a imunoglobulina sob teste inibe a ligação específica de um anticorpo de referência a um antígeno comum, tal como AA. Numerosos tipos de ensaios de ligação competitiva são conhecidos, por exemplo: radioimunoensaio direto ou indireto em fase sólida (RIA), imunoensaio enzimático direto ou indireto em fase sólida (EIA), ensaio de competição em sanduíche (ver Stahli et al., *Methods in Enzymology*, 9:242-253 (1983)); EIA de

biotina-avidina direto em fase sólida (ver Kirkland et al., *J. Immunol.* 137:3614-3619 (1986)); ensaio de marcação direta em fase sólida, ensaio em sanduíche de marcação direta em fase sólida (ver Harlow and Lane, *"Antibodies, A Laboratory Manual,"* Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA de marcação direta em fase sólida usando marcação com I-125 (ver Morel et al., *Molec. Immunol.* 25 (1):7-15 (1988)); EIA com biotina-avidina direto em fase sólida (Cheung et al., *Virology*, 176:546-552 (1990)); e RIA de marcação direta (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.*, 32:77-82 (1990)). Tipicamente, tal ensaio envolve o uso do antígeno purificado ligado a uma superfície sólida ou células que expressam o antígeno, uma imunoglobulina teste não marcada e uma imunoglobulina de referência marcada. A inibição competitiva é medida pela determinação da quantidade de marcação ligada à superfície sólida ou células na presença da imunoglobulina teste. Normalmente a imunoglobulina teste está presente em excesso. Os anticorpos identificados pelo ensaio de competição (anticorpos de competição) incluem anticorpos que se ligam no mesmo epitopo que o anticorpo de referência e anticorpos que se ligam a um epitopo adjacente suficientemente proximal ao epitopo ligado pelo anticorpo de referência para o impedimento estérico ocorrer. Normalmente, quando um anticorpo competidor está presente em excesso, inibirá a ligação específica de um anticorpo de referência a um antígeno comum em pelo menos 50% a 75%.

[000126] Um anticorpo que se liga especificamente a uma proteína amiloide significa um anticorpo que se liga à proteína amiloide com uma afinidade de pelo menos 10^7 M^{-1} . Alguns anticorpos ligam-se à proteína amiloide com afinidades entre 10^8 M^{-1} e 10^{11} M^{-1} .

[000127] Um anticorpo que se liga especificamente ao agregado de proteína amiloide tal como agregado AA sem ligar-se especificamente

à proteína amiloide monomérica significa um anticorpo que se liga ao agregado de proteína amiloide, tal como, por exemplo, fibrilas (por exemplo, AA em folha β em forma dobrada agregada tal como de um cadáver de um paciente de Amiloidose AA prévia ou um modelo animal transgênico) como descrito acima e tem pelo menos dez vezes e normalmente pelo menos de 100 vezes afinidade de ligação menor específica para formas monoméricas da proteína amiloide. Por exemplo, tal anticorpo poderia ligar-se a AA solúvel com uma afinidade de 10^9 M^{-1} e a placas com uma afinidade menor que 10^7 M^{-1} . A afinidade de tais anticorpos por placas é normalmente menos de 10^7 ou 10^6 M^{-1} . Tais anticorpos são adicionalmente ou alternativamente definidos pela intensidade de fluorescência em relação a um anticorpo de controle irrelevante (por exemplo, um anticorpo ou mistura de anticorpos policlonais a um peptídeo AA reversâmero) quando os anticorpos são contatados com fibrilas e ligação avaliada por marcação fluorescente. A intensidade de fluorescência de anticorpos que se ligam ao peptídeo AA solúvel sem ligar-se a placas está em um fator de cinco, às vezes em um fator de dois e às vezes indistinguível dentro do erro experimental daquele do anticorpo de controle.

[000128] Composições ou métodos "compreendendo" um ou mais elementos citados podem incluir outros elementos não especificamente citados. Por exemplo, uma composição que compreende o peptídeo AA engloba tanto um peptídeo AA isolado como peptídeo AA como um componente de uma sequência polipeptídica maior.

II. Doenças amiloides

1. Panorama e Patogênese

[000129] Doenças amiloides ou amiloidoses incluem diversos estados de doença que têm uma larga variedade de sintomas externos. Estas desordens têm em comum a presença de depósitos

extracelulares anormais de fibrilas proteicas, conhecidas como "depósitos amiloides" ou "placas amiloides" que têm normalmente aproximadamente 10 a 100 µm de diâmetro e são localizadas em órgãos ou regiões teciduais específicos. Tais placas são compostas principalmente de uma proteína ou peptídeo solúvel que ocorre naturalmente. Estes depósitos insolúveis são geralmente compostos de agregados laterais de fibrilas que têm aproximadamente 10 a 15 nm de diâmetro. As fibrilas amiloides produzem uma característica birrefringência maçã verde em luz polarizada, quando marcadas com o corante Congo Red. As desordens são classificadas com base nos principais componentes fibrilares que formam os depósitos de placa, como discutido abaixo.

[000130] Os peptídeos ou proteínas que formam os depósitos de placa muitas vezes são produzidos a partir de uma proteína precursora maior. Mais especificamente, a patogênese de depósitos de fibrila amiloide geralmente envolve a clivagem proteolítica de uma proteína precursora "anormal" em fragmentos. Estes fragmentos geralmente agregam-se em folhas dobradas β antiparalelas; entretanto, foi relatada que certas formas não degradadas da proteína precursora agregam-se e formam fibrilas na polineuropatia amiloide familiar (fibrilas de transtiretina variante) e amiloidose relacionada à diálise (fibrilas de β_2 microglobulina) (Tan, *et al.*, 1994, *supra*).

2. Síndromes Clínicas

[000131] Esta seção fornece descrições dos principais tipos de amiloidoses, incluindo suas composições fibrilares de placa características. É uma descoberta geral da presente invenção que as doenças amiloides podem ser tratadas pela administração de agentes que servem para estimular uma resposta imune contra um componente ou componentes dos vários depósitos amiloides doença-específicos. Como discutido em mais detalhes na Seção C abaixo, tais

componentes são preferencialmente constituintes de fibrilas que formam as placas. As seções abaixo servem para exemplificar as principais formas de amiloidose e não são destinadas a limitar a invenção.

a. Amiloidoses AL

[000132] A deposição amiloide AL está associada geralmente com quase toda discrasia da linhagem de linfócito B, variando da malignidade de células plasmáticas (mieloma múltiplo) à gamopatia monoclonal benigna. De vez em quando, a presença de depósitos amiloides pode ser um indicador primário da discrasia subjacente.

[000133] Fibrilas de depósitos amiloides AL são compostas de cadeias leves de imunoglobulina monoclonais ou fragmentos das mesmas. Mais especificamente, os fragmentos são derivados da região N-terminal da cadeia leve (capa ou lambda) e contêm todo ou parte do domínio variável (V_L) do mesmo. Os depósitos geralmente ocorrem nos tecidos mesenquimais, causando neuropatia periférica e autônoma, síndrome de túnel do carpo, macroglossia, cardiomiopatia restritiva, artropatia de grandes articulações, discrasias imunes, mielomas, bem como discrasias ocultas. Entretanto, deve ser observado que quase qualquer tecido, particularmente órgãos viscerais, tais como coração, podem ser envolvidos.

b. Amiloidoses Sistêmicas Hereditárias

[000134] Há muitas formas de amiloidoses sistêmicas hereditárias. Embora sejam condições relativamente raras, o início adulto de sintomas e seus padrões de herança (normalmente dominante autossômico) leva à persistência de tais desordens na população geral. Geralmente, as síndromes são atribuíveis a mutações pontuais em proteína precursora levando à produção de peptídeos ou proteínas amiloidogênicos variantes. A tabela 2 resume a composição fibrilar de formas exemplares destas desordens.

Tabela 2

Amiloidoses Hereditárias^a

| Peptídeo/Proteína Fibrilar | Variante genética | Síndrome clínica |
|--|-------------------------------------|---|
| Transtiretina e fragmentos (ATTR) | Met30, muitos outros | Polineuropatia amiloide familiar (FAP), (principalmente nervos periféricos) |
| Transtiretina e fragmentos (ATTR) | Thr45, Ala60, Ser84, Met111, Ile122 | Predominante envolvimento cardíaco sem neuropatia |
| Fragmento N-terminal Apolipoproteína A1 (apoA1) | Arg 26 | Polineuropatia amiloide familiar (FAP), (principalmente nervos periféricos) |
| Fragmento N-terminal Apolipoproteína A1 (ApoA1) | Arg26, Arg50, Arg 60, outros | Tipo Ostertag, não neuropática (envolvimento predominantemente visceral) |
| Lisozima (Alys) | Thr56, His67 | Tipo Ostertag, não neuropática (envolvimento predominantemente visceral) |
| Fragmento de cadeia α de fibrinogênio | Leu554, Val 526 | Tipo Ostertag, não neuropática (envolvimento predominantemente visceral) |
| Fragmento de gelsolina (Agel) | Asn187, Tyr187 | Neuropatia craniana com distrofia corneana lattice |
| Fragmento de cistatina C | Glu68 | Hemorragia cerebral hereditária (angiopatia amiloide cerebral)-Tipo islandesa |
| Proteína β -amiloide ($A\beta$) derivada de Proteína Precursora Amiloide (APP) | Gln693 | Hemorragia cerebral hereditária (angiopatia amiloide cerebral)-Tipo holandesa |
| Proteína β -amiloide ($A\beta$) derivada de Proteína Precursora Amiloide (APP) | Ile717, Phe717, Gly717 | Mal de Alzheimer Familiar |

| Peptídeo/Proteína Fibrilar | Variante genética | Síndrome clínica |
|--|--------------------------------|---|
| Proteína β -amiloide (A β) derivada de Proteína Precursora Amiloide (APP) | Asn670, Leu671 | Demência Familiar–provável Mal de Alzheimer |
| Proteína Príon (PrP) derivada da inserção 51-91 a proteína precursora de PrP | Leu102, Val167, Asn178, Lys200 | Doença de Creutzfeldt-Jakob Familiar; Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (encefalopatias espongiformes, doenças de príon) |
| AA derivada de Proteína amiloide A sérica (ApoSSA) | | Febre Mediterrânea Familiar, predominante envolvimento renal (autossômica recessiva) |
| AA derivada de Proteína amiloide A sérica (ApoSSA) | | Síndrome de Muckle-Well, nefropatia, surdez, urticária, dores nos membros |
| Desconhecido | | Cardiomiopatia com paralisia atrial persistente |
| Desconhecido | | Depósitos cutâneos (bolhosos, papulares, pustulodérmicos) |

^aDados derivada de Tan & Pepys, 1994, *supra*.

[000135] Os dados fornecidos na Tabela 2 são exemplares e não são destinados a limitar o escopo da invenção. Por exemplo, mais de 40 mutações pontuais separadas no gene de transtiretina foram descritas, todas as quais dão origem a formas clinicamente similares de polineuropatia amiloide familiar.

[000136] Transtiretina (TTR) é uma proteína de 14 kilodaltons que é também às vezes referida como pré-albumina. É produzida pelo fígado e plexo coroide, e funciona no transporte de hormônios tireoidianos e vitamina A. Pelo menos 50 formas de variantes da proteína, cada uma caracterizada por uma modificação de aminoácido única, são responsáveis por várias formas de polineuropatia amiloide familiar. Por exemplo, a substituição de prolina por leucina na posição 55 resulta

em uma forma particularmente progressiva de neuropatia; a substituição de metionina por leucina na posição 111 resultou em uma cardiopatia severa em pacientes dinamarqueses. Depósitos amiloides isolados em tecido cardíaco de pacientes com amiloidose sistêmica revelaram que os depósitos são compostos de uma mistura heterogênea de TTR e fragmentos da mesma, coletivamente referidos como ATTR, as sequências completas das quais foram caracterizadas. Os componentes fibrilares de ATTR podem ser extraídos de tais placas e sua estrutura e sequência determinada de acordo com métodos conhecidos na técnica (por exemplo, Gustavsson, A., *et al.*, Laboratory Invest. 73: 703-708, 1995; Kametani, F., *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 125: 622-628, 1984; Pras, M., *et al.*, PNAS 80: 539-42, 1983).

[000137] Pessoas que têm mutações pontuais na molécula apolipoproteína AI (por exemplo, Gly→Arg26; Trp → Arg50; Leu → Arg60) exibem uma forma da amiloidose (tipo Östertag") caracterizada por depósitos da proteína apolipoproteína AI ou fragmentos da mesma (AApoAI). Estes pacientes têm baixos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) e apresentam uma neuropatia periférica ou falência renal.

[000138] Uma mutação na cadeia alfa da enzima lisozima (por exemplo, Ile→Thr56 ou Asp→His57) é a base de outra forma amiloide hereditária não neuropática tipo Östertag relatada em famílias inglesas. Aqui, as fibrilas da proteína lisozima mutante (Alys) são depositadas, e os pacientes geralmente exibem função renal prejudicada. Esta proteína, diferentemente da maioria das proteínas formadoras de fibrila descritas neste pedido, está presente normalmente na forma inteira (não fragmentada) (Benson, M.D., *et al.* CIBA Fdn. Symp. 199: 104-131, 1996).

[000139] Peptídeo β amilóide (A β) é um peptídeo de 39 a 43

aminoácidos derivado por proteólise de uma grande proteína conhecida como proteína precursora beta amiloide (β APP). Mutações em β APP resultam em formas familiares de mal de Alzheimer, síndrome de Down e/ou demência senil, caracterizadas pela deposição cerebral de placas compostas de fibrilas $A\beta$ e outros componentes, que são descritos em detalhes adicionais abaixo. Mutações conhecidas em APP associadas com mal de Alzheimer ocorrem próximas aos sítios de clivagem β ou γ secretase, ou dentro de $A\beta$. Por exemplo, a posição 717 está próxima ao sítio γ -secretase de clivagem de APP em seu processamento em $A\beta$ e as posições 670/671 são próximas ao sítio de clivagem da β -secretase. Mutações em qualquer destes resíduos podem resultar na mal de Alzheimer, presumivelmente causando um aumento da quantidade da forma de 42/43 aminoácidos de $A\beta$ gerada a partir de APP. A estrutura e sequência de peptídeos $A\beta$ de vários comprimentos são bem conhecidas na técnica. Tais peptídeos podem ser feitos de acordo com os métodos conhecidos na técnica (*por exemplo*, Glenner and Wong, Biochem Biophys. Res. Comm. 129: 885-890, 1984; Glenner and Wong, Biochem Biophys. Res. Comm. 122: 1131-1135, 1984). Além disso, várias formas dos peptídeos estão comercialmente disponíveis.

[000140] Sinucleína é uma proteína associada à sinapse que se parece com uma alipoproteína e é abundante em citossol neuronal e terminais pré-sinápticos. Um fragmento peptídico derivado de α -sinucleína, denominado NAC, é também um componente de placas amiloides da mal de Alzheimer. (Clayton, et al., 1998). Este componente também serve como um alvo para tratamentos baseados imunologicamente da presente invenção, como detalhado abaixo.

[000141] Gelsolina é uma proteína de ligação a cálcio que se liga a e fragmenta filamentos de actina. Mutações na posição 187 (*por exemplo*, Asp→Asn; Asp→Tyr) da proteína resultam em uma forma de

amiloidose sistêmica hereditária, normalmente encontrada em pacientes da Finlândia, bem como pessoas de origem holandesa ou japonesa. Em indivíduos afligidos, fibrilas formadas a partir de fragmentos de gelsolina (Agel), normalmente consistem de aminoácidos 173 a 243 (fragmento carboxiterminal de 68 kDa) e são depositados em vasos sanguíneos e membranas basais, resultando em distrofia corneana e neuropatia cranial que progride à neuropatia periférica, modificações distróficas cutâneas e deposição em outros órgãos. (Kangas, H., *et al.* Human Mol. Genet. 5 (9): 1237-1243, 1996).

[000142] Outras proteínas mutadas, tais como a cadeia alfa mutante de fibrinogênio (AfibA) e cistatina C mutante (Acys) também formam fibrilas e produzem desordens hereditárias características. Fibrilas AfibA formam depósitos característicos de um amiloide hereditário não neuropático com doença renal; os depósitos de Acys são característicos de uma angiopatia de amiloide cerebral hereditária relatada na Islândia. (Isselbacher, *et al.*, Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill, San Francisco, 1995; Benson, *et al.*, *supra.*). Em pelo menos alguns casos, foi mostrado que pacientes com angiopatia amiloide cerebral (CAA) têm fibrilas amiloides contendo uma forma não mutante de cistatina C em conjunto com proteína beta. (Nagai, A., *et al.* Molec. Chem. Neuropathol. 33: 63-78, 1998).

[000143] Considera-se agora que certas formas da doença de príon são hereditárias, contabilizando até 15% dos casos, que foram anteriormente pensados ser predominantemente de natureza infecciosos. (Baldwin, *et al.*, *em Research Advances in Alzheimer Disease and Related Disorders*, John Wiley and Sons, New York, 1995). Em tais desordens de príon, os pacientes desenvolvem placas compostas de isoformas anormais da proteína príon normal (PrP^C). Uma isoforma mutante predominante, PrP^{Sc}, também referida como

AScr, se diferencia da proteína celular normal em sua resistência à degradação por protease, insolubilidade após extração com detergente, deposição em lisossomas secundários, síntese pós-traducional, e alto conteúdo de folha β dobrada. Ligação genética foi estabelecida em pelo menos cinco mutações resultando em doença de Creutzfeldt-Jacob (CJD), síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), e insônia familiar fatal (FFI). (Baldwin). Métodos para extrair peptídeos fibrilares de fibrilas de scrapie, determinar sequências e construir tais peptídeos são conhecidos na técnica. (por exemplo, Beekes, M., *et al.* J. General. Virol. 76: 2567-76, 1995).

[000144] Por exemplo, uma forma de GSS foi ligada a uma mutação de PrP no códon 102, enquanto GSS telencefálica segrega com uma mutação no códon 117. Mutações nos códons 198 e 217 resultam em uma forma de GSS em que placas neuríticas características da mal de Alzheimer contêm PrP em vez de um peptídeo A β . Certas formas de CJD familiar estão associadas com mutações nos códons 200 e 210; mutações nos códons 129 e 178 foram encontradas tanto em CJD familiar como em FFI. (Baldwin, *supra*).

c. Amiloidose Sistêmica Senil

[000145] Deposição amiloide, sistêmica ou focal, aumenta com a idade. Por exemplo, fibrilas da transtiretina selvagem (TTR) são comumente encontradas no tecido cardíaco de indivíduos idosos. Estas podem ser assintomáticas, clinicamente silenciosas, ou podem resultar na falência cardíaca. Depósitos focais fibrilares assintomáticos também podem ocorrer no cérebro (A β), corpos amiláceos da próstata (microglobulina A β_2), articulações e vesículas seminais.

d. Amiloidose Cerebral

[000146] A deposição local de amiloide é comum no cérebro, particularmente em indivíduos idosos. O tipo mais frequente de amiloide no cérebro é composto principalmente de fibrilas peptídicas

A β , resultando em demência ou mal de Alzheimer esporádica (não hereditária). De fato, a incidência da mal de Alzheimer esporádica excede grandemente as formas mostradas serem hereditárias. Peptídeos fibrilares que formam estas placas são muito similares aos descritos acima, com referência a formas hereditárias da mal de Alzheimer (AD).

e. Amiloidose relacionada à Diálise

[000147] Placas compostas fibrilas de microglobulina β_2 (A β_2 M) comumente desenvolvem-se em pacientes que recebem hemodiálise ou diálise peritoneal em longo prazo. Microglobulina β_2 é um polipeptídeo de 11,8 kilodaltons e é a cadeia leve de antígenos de MHC Classe I, que estão presentes em todas as células nucleadas. Sob circunstâncias normais, é continuamente dispersa de membranas celulares e é normalmente filtrada pelo rim. A falência da depuração, tal como no caso da função renal prejudicada, leva à deposição no rim e outros sítios (principalmente em tecidos ricos em colágeno das articulações). Diferentemente de outras proteínas fibrilares, as moléculas de A β_2 M estão presentes geralmente na forma não fragmentada nas fibrilas. (Benson, *supra*).

f. Amiloidoses derivadas de Hormônio

[000148] Órgãos endócrinos podem abrigar depósitos amiloides, particularmente em indivíduos idosos. Tumores secretores de hormônio também podem conter placas amiloides derivadas de hormônio, as fibrilas dos quais são compostas de hormônios polipeptídicos, tais como calcitonina (carcinoma medular da tireoide), polipeptídeo amiloide de ilhota (amilina; ocorrendo na maioria de pacientes com diabetes Tipo II), e peptídeo natriurético atrial (amiloidose atrial isolada). Sequências e estruturas destas proteínas são bem conhecidas na técnica.

g. Amiloidoses Diversas

[000149] Há uma variedade de outras formas de doença amiloide que são normalmente manifestadas como depósitos localizados de amiloide. Em geral, estas doenças são provavelmente o resultado da produção localizada e/ou falta do catabolismo de precursores de fibrila específicos ou uma predisposição de um tecido particular (tais como a articulação) para deposição fibrilar. Exemplos de tal deposição idiopática incluem amiloide AL nodular, amiloide cutâneo, amiloide endócrino e amiloide relacionado ao tumor.

III. Doenças amiloides de AA

[000150] Amiloidose AA, outrora chamada amiloidose secundária ou reativa porque se desenvolve secundariamente a uma doença pré-existente ou coexistente. Tais doenças incluem, mas não são limitadas a doenças inflamatórias, tais como artrite reumatoide, artrite crônica juvenil, espondilite anquilosante, psoríase, artropatia psoriática, síndrome de Reiter, doença de Still do Adulto, síndrome de Behcet e doença de Crohn. Depósitos de AA também são produzidos como resultado de infecções microbianas crônicas, tais como lepra, tuberculose, bronquiectasia, úlceras de decúbito, polinefrite crônica, osteomielite e doença de Whipple. Certas neoplasias malignas também podem resultar em depósitos amiloides de fibrila AA. Estes incluem tais condições como linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas de intestino, pulmão e trato urogenital, carcinoma de célula basal, e leucemia de célula cabeluda. A doença amiloide AA também pode resultar de doenças inflamatórias herdadas, tais como Febre Mediterrânea Familiar. Adicionalmente, a doença amiloide AA pode resultar de desordens linfoproliferativas, tais como Doença de Castleman.

1. Doenças Inflamatórias Associadas com Amiloidose AA

[000151] Artrite reumatoide é uma doença sistêmica crônica principalmente das articulações. Os sintomas da artrite reumatoide são

marcados por modificações inflamatórias nas membranas sinoviais e estruturas articulares (articulações) e por atrofia e rarefação (reduções de densidade óssea) dos ossos. Em estágios tardios de artrite reumatoide, deformidade e anquilose (imobilidade da articulação) desenvolvem-se. Um modelo de artrite reumatoide pode ser induzido em camundongos ou ratos pela administração de colágeno tipo II em adjuvante de Freund completo.

[000152] Artrite crônica juvenil aparece em muitas formas; a mais comum sendo artrite reumatoide juvenil. Pode ocorrer em crianças em qualquer idade, mas primeiro aparece mais comumente entre as idades de 2 e 6 anos. Há 3 tipos principais de artrite reumatoide juvenil, ou seja, artrite pauciarticular, artrite poliarticular e artrite sistêmica (também conhecida como doença de Still). A artrite pauciarticular tipicamente afeta 4 ou menos articulações, normalmente as maiores, tais como os joelhos. Pode ser acompanhada por rigidez, fazendo a criança mancar. A artrite poliarticular é caracterizada por 5 ou mais articulações que são afetadas, as mais comumente as menores articulações nas mãos e pés. Crianças com artrite poliarticular muitas vezes têm uma forma mais severa da doença. Artrite sistêmica é caracterizada pela inchaço da articulação em combinação com febre e uma erupção rósea. As articulações podem não começar a inchar até alguns meses ou anos após o início das febres. Também pode afetar órgãos internos, tais como fígado, coração, baço e linfonodos, e anemia é comum. Enquanto a artrite sistêmica tende a diminuir por conta própria, uma pequena porcentagem destas crianças pode ter artrite severa que continua na idade adulta.

[000153] Espondilite anquilosante é uma doença reumática que causa artrite das articulações espinhais e sacroilíacas e pode causar a inflamação dos olhos, pulmões, e valvas cardíacas. Varia de episódios

intermitentes de dor nas costas que ocorrem ao longo da vida a uma doença crônica severa que ataca a espinha, articulações periféricas e outros órgãos corporais, resultando em rigidez articular e rigidez nas costas, perda de movimento e deformidade conforme a vida progride.

[000154] Psoríase é uma dermatose crônica, escamosa comum, marcada por exacerbação e remissões e tendo um padrão de herança poligênica. Os sintomas da psoríase são marcados pela presença de fragmentos de descamação seca, arredondados de vários tamanhos, cobertos por escalas de branco acinzentado ou branco prateado que têm uma predileção por superfícies extensoras, unhas, escalpo, genitálias e região lombossacral.

[000155] Artropatia psoriática é uma desordem na qual a psoríase é ligada ao desenvolvimento de artrite. A desordem pode ser exibida em uma variedade de maneiras. A artrite é geralmente branda e envolve somente algumas articulações. Em alguns pacientes, a doença é severa e normalmente afeta os dedos e a espinha. Quando a espinha é afetada, os sintomas parecem-se muito com aqueles da espondilite anquilosante.

[000156] A síndrome de Reiter é um grupo de sintomas consistindo em artrite, uretrite (inflamação do trato urogenital), conjuntivite (inflamação do revestimento ocular), e lesões da pele e membranas mucosas. A síndrome de Reiter também é referida como artrite reativa, que significa que a artrite ocorre como "uma reação" a uma infecção que começou em outro lugar no corpo. *Chlamydia trachomatis* é a bactéria muitas vezes associada com a síndrome de Reiter adquirida pelo contato sexual. Várias bactérias diferentes estão associadas com a síndrome de Reiter adquirida através do trato digestório, incluindo *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* e *Campylobacter*.

[000157] A doença de Still do Adulto, também chamada Doença de Still de Início Adulto é uma condição inflamatória rara que ataca

órgãos internos, articulações e outras partes do corpo. Pode aparecer e desaparecer repentinamente. Em casos muito severos, a doença de Still do Adulto torna-se crônica e extremamente debilitante, causando dor terrível e rigidez. Após muitos anos, a doença mutila órgãos vitais, tais como coração e pulmões.

[000158] A síndrome de Behcet é uma desordem multissistêmica presente em ulcerações orais e/ou genitais recorrentes, uveítes recidivantes crônicas que podem causar cegueira e prejuízos neurológicos. É caracterizada por 4 sintomas principais: úlceras aftosas orais, lesões cutâneas, sintomas oculares e ulcerações genitais, e ocasionalmente por inflamação em tecidos e órgãos ao longo do corpo, incluindo o trato gastrointestinal, sistema nervoso central, sistema vascular, pulmões e rins. A artrite da síndrome de Behcet é normalmente febre intermitente, autolimitada, não deformante e localizada nos joelhos e tornozelos.

[000159] A doença de Crohn é uma doença inflamatória granulomatosa crônica (corpo ou crescimento similar a pequeno grão) envolvendo qualquer parte do trato gastrointestinal da boca ao ânus; mas comumente envolvendo o íleo (três-quintos inferiores do intestino delgado) com escoriações e espessamento da parede intestinal. Os sintomas da doença de Crohn incluem a presença de diarreia crônica, sons intestinais aumentados, ter cólicas, possivelmente evidenciados por perda de peso e aversão à comida.

2. Doenças de Infecção Microbiana Crônicas Associadas com Amiloidose AA

[000160] Lepra é uma doença infecciosa caracterizada chagas desfigurantes cutâneas, dano neural periférico, e debilitação progressiva. A lepra é causada pelo organismo *Mycobacterium leprae*, que não é muito contagioso e tem um período de incubação longo. Lepra tem duas formas comuns, tuberculoide e lepromatosa. Ambas

as formas produzem chagas na pele, mas a forma lepromatosa é a mais severa, produzindo grandes nódulos, desfigurantes (protuberâncias e inchaços). Lepra consequentemente causa dano neurológico periférico. Os pacientes com lepra de longo prazo podem perder o uso das suas mãos ou pés devido à injúria repetida resultando na perda de sensação.

[000161] Tuberculose é uma infecção bacteriana contagiosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*. A doença é caracterizada pelo desenvolvimento de granulomas (tumores granulares) nos tecidos infectados. Os pulmões são principalmente envolvidos, mas a infecção pode estender-se a outros órgãos.

[000162] Bronquiectasia é uma destruição anormal e dilatação das vias aéreas superiores. Bronquiectasia muitas vezes é causada por inflamação ou infecção recorrente das vias aéreas. Uma bactéria clássica que é vista em pacientes com bronquiectasia é *Pseudomonas aeruginosa*, que é notoriamente difícil de erradicar. Infecções repetidas das vias aéreas por esta bactéria podem levar à colonização dos brônquios por este organismo que predispõe tais pessoas a *pneumonias Pseudomônicas*, que requerem antibióticos especiais para tratamento.

[000163] Úlcera de decúbito também conhecida como úlcera ou ferida de pressão é uma ulceração da pele e tecidos subjacentes causados pela pressão prolongada sobre a área afetada. Começam como pele ruborizada, mas tornam-se progressivamente piores, formando uma bolha, então uma chaga aberta, e finalmente uma cratera. Estas ulcerações normalmente ocorrem sobre proeminências ósseas, tais como calcanhar, área coccígena da nádega e atrás da cabeça.

[000164] Polinefrite crônica é uma infecção do rim e dos ureteres (tubos que carregam a urina para fora do rim). A polinefrite muitas

vezes ocorre como resultado da infecção do trato urinário, particularmente na presença de refluxo de urina ocasional ou persistente da bexiga nos ureteres ou pelve renal.

[000165] Osteomielite é uma infecção óssea aguda ou crônica, normalmente causada por bactérias. Muitas vezes, a infecção inicia em outra parte do corpo e espalha-se para o osso através do sangue. Quando o osso é infectado, pus é produzido dentro do osso, que pode resultar em um abscesso. O abscesso então priva o osso da sua provisão de sangue. Osteomielite crônica resulta quando o tecido ósseo morre como resultado da perda da provisão sanguínea. A infecção crônica pode persistir intermitentemente por anos.

[000166] A doença de Whipple é uma condição rara que causa absorção inadequada de nutrientes do trato intestinal devido à infecção do intestino. É causado pelas bactérias, *Tropheryma whippelii*. Os sintomas incluem diarreia, hemorragia intestinal, dor abdominal, perda de apetite, perda de peso, fadiga e fraqueza. Artrite e febre muitas vezes ocorrem vários anos antes que os sintomas intestinais se desenvolvam. Os pacientes podem experimentar sintomas neurológicos também. O diagnóstico é baseado em sintomas e nos resultados de uma biópsia do tecido do intestino delgado ou outros órgãos que são afetados. Quando reconhecida e tratada, a doença de Whipple pode ser normalmente curada. Sem tratamento, a condição é normalmente fatal.

3. Neoplasias Malignas Associadas com Amiloidose AA

[000167] Linfoma de Hodgkin é um câncer do tecido linfático encontrado nos linfonodos, baço, fígado e medula óssea. O primeiro sinal deste câncer é muitas vezes um linfonodo aumentado. A doença pode estender-se a linfonodos próximos e após pode estender-se aos pulmões, fígado, ou medula óssea.

[000168] Carcinoma renal é o câncer do rim. As células cancerosas

são encontradas no revestimento de túbulos no rim. O primeiro sintoma é normalmente sangue na urina. Às vezes ambos os rins estão envolvidos. O câncer espalha-se facilmente, muitas vezes aos pulmões e outros órgãos. Carcinoma de célula renal é tipo mais comum do câncer de rim seguido pelo carcinoma de célula renal papilar, carcinoma renal cromóforo e carcinoma renal de ducto coletor. Aproximadamente 5% dos carcinomas renais são não classificados porque sua aparência não se ajusta em nenhuma das outras categorias.

[000169] Carcinomas do intestino incluem cânceres gastrintestinais tais como colorretal, pancreático, estomacal e esofágico. O câncer colorretal é o câncer que surge no intestino grosso ou no reto. Quase todos os cânceres colorretais começam como pólipos benignos que, durante o período de muitos anos, se desenvolvem em cânceres. A maioria dos casos de câncer colorretal não têm sintomas. Câncer pancreático é uma malignidade do pâncreas. Os sintomas incluem dor abdominal, perda do apetite, perda de peso significativa e icterícia indolor. Câncer de estômago, também chamado câncer gástrico, pode desenvolver-se em qualquer parte do estômago e pode espalhar-se ao longo do estômago e para outros órgãos; particularmente o esôfago e intestino delgado. Também pode espalhar-se, através da parede do estômago, a linfonodos próximos e órgãos, tais como fígado, pâncreas, e pulmões, ou a órgãos distantes, tais como os linfonodos acima da clavícula, cólon e ovários. Câncer de estômago é muitas vezes assintomático. Câncer esofágico é malignidade do esôfago. Sintomas incluem disfagia (dificuldade de engolir), dor e perda de peso substancial.

[000170] Carcinomas do pulmão são um câncer dos pulmões caracterizados pela presença de tumores malignos. Há dois tipos principais do câncer de pulmão: câncer de não pequenas células de

pulmão e câncer de pequenas células de pulmão. Sintomas dependem de tipo específico do câncer, mas podem incluir tosse crônica, tosse com sangue, falta de ar, respiração ofegante, dor no peito, perda de apetite, perda de peso e fadiga.

[000171] Carcinomas do trato urogenital incluem, mas não são limitados a câncer de próstata, câncer de bexiga, câncer do endométrio, câncer cervical e câncer ovariano. Câncer de próstata envolve um crescimento tumoral maligno dentro da glândula próstata. Sintomas podem incluir urinação frequente, dificuldade em iniciar e manter uma corrente constante de urina, sangue na urina, urinação dolorosa, dificuldade de alcançar ereção ou ejaculação dolorosa. Câncer de bexiga refere-se a algum dos vários tipos de crescimentos malignos da bexiga urinária. Sintomas incluem sangue na urina, urinação frequente, urinação dolorosa e urgência urinária. Câncer do endométrio envolve crescimento canceroso do endométrio (revestimento do útero). Ocorre principalmente após menopausa, e apresenta-se hemorragia vaginal. Câncer cervical é uma malignidade do cérvix. Os estágios iniciais do câncer cervical podem ser completamente assintomáticos. Hemorragia vaginal pode indicar a presença de malignidade. Em estágios avançados, metástases podem estar presentes no abdômen, pulmões ou em outro lugar. Câncer ovariano é uma neoplasia maligna dos ovários. Sintomas de câncer ovariano são muitas vezes vagos e não específicos, que incluem desconforto vago abdominal inferior, sentido de peso pélvico, ciclo menstrual anormal, hemorragia vaginal, ganho ou perda de peso, sintomas gastrintestinais não específicos. Cânceres ovarianos liberam células de câncer que muitas vezes se implantam no útero, bexiga, intestino e revestimento da parede intestinal. Estas células de câncer podem começar a formar novos tumorais que crescem antes que o câncer seja até suspeito.

[000172] Carcinoma de célula basal é um tumor de pele de crescimento lento envolvendo modificações cancerosas em células cutâneas basais. Sintomas incluem lesões cutâneas localizadas no rosto, orelha, pescoço, peito, costas ou escalpo; vasos sanguíneos visíveis na lesão ou pele adjacente; e chagas persistentes, que não se curam. Este câncer normalmente permanece local e quase nunca se espalha a partes distantes do corpo, mas pode continuar crescendo e invadir tecidos e estruturas próximas, incluindo nervos, ossos e cérebro.

[000173] Leucemia de célula cabeluda é um câncer de linfócitos (células B) que leva a contagens sanguíneas baixas. A doença é causada pelas células B anormalmente formadas com projeções similares a cabelo. Sintomas são muitas vezes vagos. As contagens sanguíneas baixas causadas pela leucemia de célula cabeluda podem levar a infecções, fadiga e hemorragia excessiva.

4. Doença Inflamatória Herdada Associada com AA

[000174] Febre Mediterrânea Familiar é uma desordem herdada caracterizada por febre e inflamação recorrentes, muitas vezes envolvendo o abdômen ou o pulmão. Sintomas incluem inflamação no revestimento da cavidade abdominal, cavidade torácica, pele, ou articulações ocorrem, junto com febres altas que normalmente chegam ao ponto máximo em 12 a 24 horas. Ataques podem variar na severidade de sintomas, e pessoas são normalmente livres de sintoma entre os ataques. Esta doença é muito rara. Fatores de riscos incluem uma história familiar de Febre Mediterrânea Familiar ou tendo ancestralidade Mediterrânea.

5. Desordens Linfoproliferativas Associadas com Amiloidose AA

[000175] Doença de Castleman é uma forma patologicamente caracterizada de desordem linfoproliferativa pela presença de hiperplasia do linfonodo gigante com infiltração celular plasmática.

Pacientes com Doença de Castleman comumente têm febre, anemia, hipergamaglobulinemia, e um aumento nas concentrações séricas de proteínas de reagente de fase aguda, todas as quais são referidas à grande quantidade de IL-6 produzida nos linfonodos.

IV. Amiloide Sérica A

1. Amiloide Sérica Humana A

[000176] Amiloide sérica (SAA) é o precursor circulante da proteína amiloide A, o componente fibrilar de depósitos amiloides. Os estudos estruturais mostraram que a SAA humana é heterogênea e representa uma família de genes SAA polimórficos e produtos proteicos. A superfamília gênica SAA compreende um grupo de genes estreitamente ligados localizados em 11p15.1. Ver Sellar, GC et al. *Genomics* 19: 221-227 (1994). Quatro genes SAA foram descritos em humanos. Sequências de aminoácido representativas de proteínas codificadas por quatro genes SAA são ilustradas pela figura 1. Dois genes (SAA1 e SAA2) codificam amiloide sérica A de fase aguda (A-SAA) e são coordenadamente induzidos em resposta à inflamação. SAA1 e SAA2 compartilham identidade de sequência de 95% tanto em regiões codificantes como em não codificantes. Há isoformas alfa, beta e gama de SAA1 humana e isoformas alfa e beta de SAA2 humana como ilustradas pelas Figuras 18 e 19. SAA3 é um pseudogene. SAA4 codifica SAA constitutivo e é minimamente induzível. Ver Cunnane G. *Bailliere's Clin. Rheumatol.* 13 (4): 615-628. Todas as moléculas SAA/AA humanas contêm uma ligação de sequência tetrapeptídica de cálcio teórica, Gly-Pro-Gly-Gly, de importância possível para autoagregação e com porções extrafibrilares de amiloide em fibrilogênese. Ver Fykse, E.M. et al. *Biochem. J.* 256:973-980 (1988) e Turnell et al. *Mol. Biol. Med.* 3:387-407 (1986). A porção N terminal de SAA/AA é fortemente hidrofóbica, provavelmente de importância para autoagregação e outros componentes em depósitos amiloides. Ver

Husby et al. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 70 (1):2-9 (1994). A sequência de cada isoforma de AA e sua relação à sua isoforma SAA correspondente é ilustrada pelas figuras 2 a 5. Por exemplo, a isoforma SAA1 alfa humana tem sequência:

H₂N-Met-Lys-Leu-Leu-Thr-Gly-Leu-Val-Phe-Cys-Ser-Leu-Val-Leu-Gly-Val-Ser-Ser-Arg-Ser-Phe-Phe-Ser-Phe-Leu-Gly-Glu-Ala-Phe-Asp-Gly-Ala-Arg-Asp-Met-Try-Arg-Ala-Tyr-Ser-Asp-Met-Arg-Glu-Ala-Asn-Tyr-Ile-Gly-Ser-Asp-Lys-Tyr-Phe-His-Ala-Arg-Gly-Asn-Tyr-Asp-Ala-Ala-Lys-Arg-Gly-Pro-Gly-Gly-Ala-Try-Ala-Ala-Glu-Val-Ile-Ser-Asp-Ala-Arg-Glu-Asn-Ile-Gln-Arg-Phe-Phe-Gly-His-Gly-Ala-Glu-Asp-Ser-Leu-Ala-Asp-Gln-Ala-Ala-Asn-Glu-Try-Gly-Arg-Ser-Gly-Lys-Asp-Pro-Asn-His-Phe-Arg-Pro-Ala-Gly-Leu-Pro-Glu-Lys-Tyr-OH (SEQ ID Nº:1).

[000177] AA, que é um fragmento proteolítico de SAA, é também heterogêneo. O peptídeo AA humano predominante consiste de 76 aminoácidos. Um exemplo de AA tem a sequência:

H₂N-Arg-Ser-Phe-Phe-Ser-Phe-Leu-Gly-Glu-Ala-Phe-Asp-Gly-Ala-Arg-Asp-Met-Try-Arg-Ala-Tyr-Ser-Asp-Met-Arg-Glu-Ala-Asn-Tyr-Ile-Gly-Ser-Asp-Lys-Tyr-Phe-His-Ala-Arg-Gly-Asn-Tyr-Asp-Ala-Ala-Lys-Arg-Gly-Pro-Gly-Gly-Ala-Try-Ala-Ala-Glu-Val-Ile-Ser-Asp-Ala-Arg-Glu-Asn-Ile-Gln-Arg-Phe-Phe-Gly-His-Gly-Ala-Glu-Asp-Ser-OH (SEQ ID Nº:2).

AA70-76 refere-se a um fragmento AA que começa no resíduo 70 e termina no resíduo 76 da (SEQ ID Nº:2) consistindo da sequência GHGAEDS, (SEQ ID Nº: 4), ou segmento correspondente de outra proteína de AA que ocorre naturalmente de uma espécie humana ou outra quando a sequência daquela proteína é maximamente alinhada com SEQ ID Nº:2.

2. Amiloide Sérica Murina A

[000178] No camundongo, quatro genes SAA foram descritos. sequências de aminoácido representativas de proteínas codificadas por quatro genes de SAA murinos são ilustradas pela figura 8. A

família gênica de SAA de camundongo compreende quatro membros que são estreitamente ligados no cromossomo 7. Dois destes genes que codificam os principais isotipos de SAA de camundongo (SAA1 e SAA2) compartilham alta identidade de sequência não somente em éxons, mas também em íntrons e regiões flanqueadoras e são induzidos em quantidades aproximadamente iguais em resposta a modelos de indução de amiloide. Estes dois isotipos diferenciam-se em somente 9 dos 103 resíduos de aminoácidos; entretanto, somente SAA2 é seletivamente depositado em fibrilas amiloides. Ver de Beer M.C. *Biochem J.* 1991 280 (Pt 1): 45-49 (1991); Hoffman J.S. et al. *J Exp Med.* 159:641-646 (1984); Shiroo M et al. *Scand J. Immunol.* 26:709-716 (1987). SAA3 é uma apolipoproteína HDL menor e perifericamente produziu a fase aguda. SAA4 é uma subfamília constitutiva que é uma apolipoproteína HDL normal menor compreendendo mais de 90% de SAA durante a homeostase. Ver Stearman R.S et al. *Nucleic Acids Research*, 14(2)797-809 (1986) e de Beer M.C. *Genomics*, 34 (1):139-42 (1996).

[000179] AA murina que é um fragmento proteolítico de SAA é também heterogêneo. A sequência de cada isoforma murina de AA e sua relação à sua isoforma de SAA correspondente é ilustrada pelas figuras 9 a 12. Um alinhamento de sequência de AA1, AA2, AA3 e AA4 murina é ilustrado pela figura 13.

[000180] AA1 murina é a equivalente murina de AA1 humana. Ver figura 16. Em particular, resíduos 69 a 75 de AA1 murina (GRGHEDT, SEQ ID Nº: 9) são maximamente alinhados com resíduos 70 a 76 de AA1 humana (GHGAEDS, SEQ ID Nº: 4). Ver também figura 17.

3. Amiloide A Sérica de Shar Pei

[000181] A sequência de Shar Pei é indicada na figura 20. Curiosamente, a região homóloga na proteína SAA humana-AEDS, (SEQ ID Nº: 13) contém uma substituição conservada Thr para Ser na

posição 76, bem como cadeia lateral significativamente diferente do resíduo na posição 73 (His para Ala; figura 1). O-AEDS, (SEQ ID N^o: 13), a sequência também é observada nas espécies caninas Shar Pei, uma raça que é particularmente suscetível à AA-amiloidose e pode fornecer um modelo de ocorrência natural de AA sistêmico para avaliar novas aplicações diagnósticas e terapêuticas de anticorpos específicos para amiloide AA e outros compostos.

4. O Segmento N-terminal de Proteína AA Determina sua Propriedade Fibrilogênica

[000182] A proteína fibrilar amiloide AA consiste de uma parte do N-terminal longa variada da proteína precursora sérica AA. Evidência mostra que a parte amiloidogênica da molécula é o segmento N-terminal de 10 a 15 aminoácidos de comprimento. Substituições de aminoácido nesta parte da molécula podem explicar porque somente uma das duas isoformas de SAA de camundongo é amiloidogênica. Ver Westermarck G.T. *Biochem Biophys Res Commun.* 182 (1):27-33 (1992).

V. Outras Proteínas Amiloidogênicas Humanas

[000183] Os Números de acesso no Genbank e sequências X₁EDX₂ são fornecidos abaixo na Tabela 3 para várias proteínas amiloidogênicas humanas, incluindo algumas daquelas listadas acima na Tabela 2.

Tabela 3

Proteínas Amiloidogênicas Humanas

| Proteína Amiloidogênica Humana | Sequência consenso | Número de acesso no Genbank |
|--------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| SAA1 | AEDS, (SEQ ID N ^o : 13) | |
| SAA2 | AEDS, (SEQ ID N ^o : 13) | |
| SAA3 | AEDS, (SEQ ID N ^o : 13) | |

| Proteína Amiloidogênica Humana | Sequência consenso | Número de acesso Genbank |
|---|------------------------------------|--------------------------|
| SAA4 | AEDS, (SEQ ID N ^o : 13) | |
| região V da cadeia leve capa da imunoglobulina anti-Sm; cadeia capa do anticorpo monoclonal 4B4 | AEDV, (SEQ ID N ^o : 23) | AAB26897 |
| região variável da imunoglobulina usada pela cadeia leve capa ITC52 (subgrupo V capa IIIb) | PEDS, (SEQ ID N ^o : 26) | AAC61608 |
| região variável da imunoglobulina usada pela cadeia leve capa ITC48 (subgrupo V capa IV) | AEDV, (SEQ ID N ^o : 23) | AAC61606 |
| precursor da cadeia leve capa de anti-RhD monoclonal T125 | SEDF, (SEQ ID N ^o : 24) | AAW82027 |
| precursor da cadeia leve capa da imunoglobulina | AEDV, (SEQ ID N ^o : 23) | CAA45496 |
| região variável da cadeia leve capa da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID N ^o : 22) | AAT44350 |
| região variável da cadeia leve capa da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID N ^o : 22) | AAT44349 |
| região variável da cadeia leve capa da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID N ^o : 22) | AAT44348 |
| cadeia leve capa da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID N ^o : 22) | CAA09185 |
| cadeia leve capa da imunoglobulina | SEDF, (SEQ ID N ^o : 24) | CAA09181 |
| região variável da cadeia leve capa da imunoglobulina | SEDF, (SEQ ID N ^o : 24) | AAU14891 |
| cadeia leve capa da imunoglobulina anti-rábica SOJA | PEDF, (SEQ ID N ^o : 22) | AAO17825 |
| região variável da cadeia leve capa da imunoglobulina antiestreptocócica/antimiosina | SEDF, (SEQ ID N ^o : 24) | AAB68786 |
| região variável da cadeia leve capa da imunoglobulina antiestreptocócica/antimiosina | PEDF, (SEQ ID N ^o : 22) | AAB68785 |
| região variável da cadeia leve capa da imunoglobulina anti-HLA-A2/anti-HLA-A28 | PEDF, (SEQ ID N ^o : 22) | AAC99644 |
| região V da cadeia leve capa da imunoglobulina; anticorpo anti-DNA 18/2 | PEDF, (SEQ ID N ^o : 22) | AAB62946 |
| cadeia leve capa da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID N ^o : 22) | BAF75949 |

| Proteína Amiloidogênica Humana | Sequência consenso | Número de acesso no Genbank |
|---|------------------------|-----------------------------|
| cadeia leve capa da imunoglobulina 48d anti-gp120 de HIV-1 | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | AAR88370 |
| cadeia leve capa da imunoglobulina | PEDL, (SEQ ID Nº: 27) | BAA97671 |
| cadeia leve capa da imunoglobulina anti-Entamoeba histolytica | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | BAA82105 |
| cadeia leve capa da imunoglobulina anti-Entamoeba histolytica | TEDV, (SEQ ID Nº: 28) | BAA82102 |
| cadeia leve capa da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | AAC41705 |
| região variável da cadeia leve capa da IgM monoclonal anti-gliangliosídeo GM2 | AEDV, (SEQ ID Nº: 23) | AAC26480 |
| região variável da cadeia leve capa da imunoglobulina anti-SARS-CoV | PEDV, (SEQ ID Nº: 151) | AAT51719 |
| região variável da cadeia leve capa da imunoglobulina anti-SARS-CoV | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | AAT51718 |
| região VLJ da cadeia leve capa da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | BAD27502 |
| região VLJ da cadeia leve capa da imunoglobulina | SEDF, (SEQ ID Nº: 24) | BAD27497 |
| cadeia leve capa da imunoglobulina 47e anti-gp120 de HIV-1 | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | AAR88378 |
| cadeia leve capa da imunoglobulina 16c anti-gp120 de HIV-1 | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | AAR88374 |
| cadeia leve capa da imunoglobulina 411g anti-gp120 de HIV-1 | SEDF, (SEQ ID Nº: 24) | AAR88372 |
| região variável da cadeia leve capa da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | AAF14212 |
| região variável da cadeia leve capa da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | AAF14211 |
| região variável da cadeia leve capa da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | AAF14210 |
| região variável da cadeia leve capa da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | AAF14209 |
| cadeia leve capa da região V da imunoglobulina | PEDI, (SEQ ID Nº: 21) | AAR02415 |
| cadeia leve capa da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | AAM46647 |
| cadeia leve capa da imunoglobulina | AEDV, (SEQ ID Nº: 23) | AAM46643 |

| Proteína Amiloidogênica Humana | Sequência consenso | Número de acesso Genbank |
|---|--|--------------------------|
| cadeia leve capa da imunoglobulina anti-Entamoeba histolytica | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | BAA82103 |
| região variável capa da cadeia leve da imunoglobulina | AEDV, (SEQ ID Nº: 23) | AAL65723 |
| região variável capa da cadeia leve da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | AAL65718 |
| região variável capa da cadeia leve da imunoglobulina | SEDF, (SEQ ID Nº: 24) | AAL65717 |
| região variável capa da cadeia leve da imunoglobulina | SEDF, (SEQ ID Nº: 24) | AAL65716 |
| região variável capa da cadeia leve da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | AAL65714 |
| região variável capa da cadeia leve da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | AAL65713 |
| região variável capa da cadeia leve da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | AAL65712 |
| região variável capa da cadeia leve da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | AAL65711 |
| região variável capa da cadeia leve da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | AAL65710 |
| região variável capa da cadeia leve da imunoglobulina | LEDG, (SEQ ID Nº: 31) PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | AAL65709 |
| região variável capa da cadeia leve da imunoglobulina | LEDG, (SEQ ID Nº: 31) PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | AAL65708 |
| região variável capa da cadeia leve da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | AAL65707 |
| região variável capa da cadeia leve da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | AAL65706 |
| região variável capa da cadeia leve da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | AAL65705 |
| região variável capa da cadeia leve da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | AAL65704 |
| região variável capa da cadeia leve da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | AAL65703 |
| região variável da cadeia leve capa da imunoglobulina | SEDF, (SEQ ID Nº: 24) | AAC64146 |
| região variável da cadeia leve capa da imunoglobulina | SEDF, (SEQ ID Nº: 24) | AAC64144 |

| Proteína Amiloidogênica Humana | Sequência consenso | Número de acesso Genbank |
|--|-----------------------|--------------------------|
| região variável da cadeia leve capa da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | ABI64139 |
| cadeia leve capa da imunoglobulina anti-polissacarídeo capsular pneumocócico | AEDV, (SEQ ID Nº: 23) | AAL04535 |
| região variável capa da cadeia leve da imunoglobulina | AEDV, (SEQ ID Nº: 23) | AAL65722 |
| região variável capa da cadeia leve da imunoglobulina | AEDV, (SEQ ID Nº: 23) | AAL65720 |
| região V-J da cadeia leve da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | BAA19563 |
| região V-J da cadeia leve da imunoglobulina | AEDE, (SEQ ID Nº: 19) | BAA19562 |
| região V-J da cadeia leve da imunoglobulina | AEDE, (SEQ ID Nº: 19) | BAA19561 |
| região V-J da cadeia leve da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | BAA19560 |
| região V-J da cadeia leve da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | BAA19559 |
| região V-J da cadeia leve da imunoglobulina | AEDV, (SEQ ID Nº: 23) | BAA19558 |
| região V-J da cadeia leve da imunoglobulina | PEDI, (SEQ ID Nº: 21) | BAA19556 |
| região variável da cadeia leve capa da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | AAA71907 |
| região variável da cadeia leve capa da imunoglobulina | AEDV, (SEQ ID Nº: 23) | AAA71905 |
| região variável da cadeia leve da imunoglobulina Fab G1 | AEDV, (SEQ ID Nº: 23) | BAF49281 |
| região variável da cadeia leve da imunoglobulina Fab G1 | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | BAF48998 |
| região variável da cadeia leve da imunoglobulina Fab G1 | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | BAF48996 |
| região V da cadeia leve capa | AEDM, (SEQ ID Nº: 32) | CAA37675 |
| região variável da cadeia leve da imunoglobulina Fab G1 | SEDF, (SEQ ID Nº: 24) | BAF48994 |
| região variável da cadeia leve da imunoglobulina Fab G1 | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | BAF48992 |
| região V-J-C precursora da cadeia de Ig | AEDV, (SEQ ID Nº: 23) | A53261 |

| Proteína Amiloidogênica Humana | Sequência consenso | Número de acesso Genbank |
|---|-----------------------|--------------------------|
| região V precursora da cadeia de Ig | AEDV, (SEQ ID Nº: 23) | A49137 |
| região V-I precursora da cadeia de Ig | SEDI, (SEQ ID Nº: 29) | PN0445 |
| região V-III precursora da cadeia de Ig (EVI-15) | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | A32274 |
| região V-IV de cadeia capa de Ig (Dep) | AEDV, (SEQ ID Nº: 23) | A34153 |
| região V-IV de cadeia capa de Ig (Fue) | AEDV, (SEQ ID Nº: 23) | B34153 |
| região V-II de cadeia capa de Ig (Pec) | AEDV, (SEQ ID Nº: 23) | C34153 |
| Cadeia L, Fragmento Fab Igg (Ligação a Cd25). | AEDA, (SEQ ID Nº: 62) | 1MIM_L |
| Cadeia H, Fragmento Fab Igg (Ligação a Cd25). | HEDS, (SEQ ID Nº: 33) | 1MIM_H |
| região de cadeia C de Ig mu, forma agrupada secretada | CEDD, (SEQ ID Nº: 34) | MHHU |
| região da cadeia capa VJ da imunoglobulina | AEDV, (SEQ ID Nº: 23) | AAA58923 |
| região variável da cadeia leve capa recombinante do anticorpo monoclonal IgM 12 | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | ABA41551 |
| cadeia leve da imunoglobulina | AEDE, (SEQ ID Nº: 19) | CAA65054 |
| região variável lambda da cadeia leve da imunoglobulina | AEDE, (SEQ ID Nº: 19) | AAL65769 |
| região variável lambda da cadeia leve da imunoglobulina | AEDE, (SEQ ID Nº: 19) | AAL65767 |
| região variável lambda da cadeia leve da imunoglobulina | AEDE, (SEQ ID Nº: 19) | AAL65765 |
| região variável lambda da cadeia leve da imunoglobulina | TEDE, (SEQ ID Nº: 16) | AAL65764 |
| região variável lambda da cadeia leve da imunoglobulina | AEDE, (SEQ ID Nº: 19) | AAL65763 |
| região variável lambda da cadeia leve da imunoglobulina | SEDE, (SEQ ID Nº: 18) | AAL65762 |
| região variável lambda da cadeia leve da imunoglobulina | SEDE, (SEQ ID Nº: 18) | AAL65761 |
| região variável lambda da cadeia leve da imunoglobulina | SEDE, (SEQ ID Nº: 18) | AAL65760 |

| Proteína Amiloidogênica Humana | Sequência consenso | Número de acesso no Genbank |
|--|---|-----------------------------|
| região variável lambda da cadeia leve da imunoglobulina | AEDE, (SEQ ID Nº: 19) | AAL65759 |
| região variável lambda da cadeia leve da imunoglobulina | AEDE, (SEQ ID Nº: 19) | AAL65758 |
| região V-J da cadeia leve da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | BAA19563 |
| região V-J da cadeia leve da imunoglobulina | AEDE, (SEQ ID Nº: 19) | BAA19562 |
| região V-J da cadeia leve da imunoglobulina | AEDE, (SEQ ID Nº: 19) | BAA19561 |
| região V-J da cadeia leve da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | BAA19560 |
| região V-J da cadeia leve da imunoglobulina | PEDF, (SEQ ID Nº: 22) | BAA19559 |
| região V-J da cadeia leve da imunoglobulina | AEDV, (SEQ ID Nº: 23) | BAA19558 |
| região V-J da cadeia leve da imunoglobulina | PEDI, (SEQ ID Nº: 21) | BAA19556 |
| região variável lambda da cadeia leve da imunoglobulina 30 | AEDE, (SEQ ID Nº: 19) | AAK95335 |
| PREDITO: similar ao precursor de receptor II-a da região gama de Fc da imunoglobulina de Baixa afinidade (Fc-gama RII-a) (FcRII-a) (receptor II-a de Fc de IgG) (Fc-gama-RIIa) (antígeno CD32) (CDw32) | QEDS, (SEQ ID Nº: 35) | XP_001129584 |
| fragmento Fc de IgG, Ia de alta afinidade, receptor (CD64) | REDS, (SEQ ID Nº: 36) TEDG, (SEQ ID Nº: 37) QEDR, (SEQ ID Nº: 38) | NP_000557 |
| fragmento Fc de IgG, IIb de baixa afinidade, receptor para (CD32) isoforma 2 | QEDS, (SEQ ID Nº: 35) | NP_001002273 XP_943944 |
| fragmento Fc de IgG, IIb de baixa afinidade, receptor para (CD32) isoforma 1 | QEDS, (SEQ ID Nº: 35) | NP_003992 |
| fragmento Fc de IgG, IIb de baixa afinidade, receptor para (CD32) isoforma 4 | QEDS, (SEQ ID Nº: 35) | NP_001002275 |

| Proteína Amiloidogênica Humana | Sequência consenso | Número de acesso no Genbank |
|---|---|------------------------------|
| fragmento Fc de IgG, IIb de baixa afinidade, receptor para (CD32) isoforma 3 | QEDS, (SEQ ID Nº: 35) | NP_001002274 XP_001129592 |
| fragmento Fc de IgG, Ib de alta afinidade, receptor (CD64) isoforma a | QEDR, (SEQ ID Nº: 38) | NP_001017986 |
| fragmento Fc de IgG, Ib de alta afinidade, receptor (CD64) isoforma b | QEDR, (SEQ ID Nº: 38) | NP_001004340 XP_496386 |
| fragmento Fc de IgG, IIa de baixa afinidade, receptor (CD32) | QEDS, (SEQ ID Nº: 35) | NP_067674 XP_943942 |
| precursor III-B de receptor de região Fc gama de imunoglobulina de baixa afinidade | TEDL, (SEQ ID Nº: 39) PEDN, (SEQ ID Nº: 40) EEDP, (SEQ ID Nº: 41) | NP_000561 |
| fragmento Fc de IgG, IIIa de baixa afinidade, receptor para (CD16) | TEDL, (SEQ ID Nº: 39) PEDN, (SEQ ID Nº: 40) EEDP, (SEQ ID Nº: 41) | NP_000560 XP_001133750 |
| precursor II-a de receptor de região Fc gama de imunoglobulina de baixa afinidade (Fc-gama RII-a) (FcRII-a) (receptor II-a de Fc de IgG) (Fc-gama-RIIa) (antígeno CD32) (CDw32) | QEDS, (SEQ ID Nº: 35) | P12318 |
| precursor III-B de receptor de região Fc gama de imunoglobulina de baixa afinidade (IgG Fc receptor III-1) (Fc-gama RIII-beta) (Fc-gama RIIIb) (FcRIIIb) (Fc-gama RIII) (FcRIII) (FcR-10) (antígeno CD16b) | TEDL, (SEQ ID Nº: 39) PEDN, (SEQ ID Nº: 40) EEDP, (SEQ ID Nº: 41) | O75015 |
| precursor III-A de receptor de região Fc gama de imunoglobulina de baixa afinidade (IgG Fc receptor III-2) (Fc-gama RIII-alpha) (Fc-gama RIIIa) (FcRIIIa) (Fc-gama RIII) (FcRIII) (FcR-10) (antígeno CD16a) | TEDL, (SEQ ID Nº: 39) PEDN, (SEQ ID Nº: 40) EEDP, (SEQ ID Nº: 41) | P08637 |

| Proteína Amiloidogênica Humana | Sequência consenso | Número de acesso no Genbank |
|---|--|-----------------------------|
| precursor I de receptor de Fc gama de imunoglobulina de alta afinidade (Fc-gama RI) (FcRI) (IgG Fc receptor I) (antígeno CD64). | REDS, (SEQ ID Nº: 36) TEDG, (SEQ ID Nº: 37) QEDR, (SEQ ID Nº: 38) | P12314 |
| gama 1 constante pesada da imunoglobulina IGHG1 (marcador G1m) | AEDT, (SEQ ID Nº: 14) | Q6PJA4 |
| apoAI [Homo sapiens] | LEDL, (SEQ ID Nº: 42) | CAA01253 |
| apolipoproteína precursora C-III [Homo sapiens] | AEDA, (SEQ ID Nº: 62) | NP_000031 |
| apolipoproteína precursora A-IV [Homo sapiens]. | AEDV, (SEQ ID Nº: 23) | NP_000473 |
| gelsolina (amiloidose, tipo finlandesa) [Homo sapiens] | TEDT, (SEQ ID Nº: 30) KEDA, (SEQ ID Nº: 43) SEDC, (SEQ ID Nº: 44) QEDL, (SEQ ID Nº: 63) | CAM20459 |
| gelsolina (amiloidose, tipo finlandesa) [Homo sapiens] | TEDT, (SEQ ID Nº: 30) KEDA, (SEQ ID Nº: 43) SEDC, (SEQ ID Nº: 44) QEDL, (SEQ ID Nº: 63) | CAI14413 |
| gelsolina (amiloidose, tipo finlandesa), isoforma CRA_c [Homo sapiens]. | TEDT, (SEQ ID Nº: 30) KEDA, (SEQ ID Nº: 43) SEDC, (SEQ ID Nº: 44) QEDL, (SEQ ID Nº: 63) | EAW87491 |

| Proteína Amiloidogênica Humana | Sequência consenso | Número de acesso no Genbank |
|--|--|-----------------------------|
| gelsolina (amiloidose, tipo finlandesa), isoforma CRA_b [Homo sapiens] | TEDT, (SEQ ID Nº: 30) KEDA, (SEQ ID Nº: 43) SEDC, (SEQ ID Nº: 44) QEDL, (SEQ ID Nº: 63) | EAW87490 |
| gelsolina (amiloidose, tipo finlandesa), isoforma CRA_a [Homo sapiens] | TEDT, (SEQ ID Nº: 30) KEDA, (SEQ ID Nº: 43) SEDC, (SEQ ID Nº: 44) QEDL, (SEQ ID Nº: 63) | EAW87489 |
| proteína precursora amiloide; APP [Homo sapiens]. | AEDV, (SEQ ID Nº: 23) | AAB23646 |
| proteína precursora amiloide; APP [Homo sapiens]. | AEDV, (SEQ ID Nº: 23) | AAB19991 |
| peptídeo amiloide | AEDV, (SEQ ID Nº: 23) | AAA51768 |
| Proteína precursora amiloide beta A4 (APP) (ABPP) (proteína amiloide da doença de Alzheimer) (Peptídeo amiloide cerebral vascular) (CVAP) (Nexina-II protease) (PN-II) (APPI) (PreA4) [Contém: APP-alfa solúvel (S-APP-alfa); APP-beta solúvel (S-APP-beta); C99; Proteína beta-amiloide 42 (Beta-APP42); Proteína beta-amiloide 40 (Beta-APP40); C83; P3(42); P3(40); Gama-CTF(59) (fragmento 59 de gama-secretase C-terminal) (Domínio intracelular amiloide59) (AID(59)) (AICD-59); Gama-CTF(57) (fragmento 57 de gama-secretase C-terminal) (Domínio intracelular amiloide 57) (AID(57)) (AICD-57); Gama-CTF(50) (fragmento 50 de gama-secretase C-terminal) (Domínio intracelular amiloide 50) (AID(50)) (AICD-50); C31]. | EEDD, (SEQ ID Nº:45) SEDK, (SEQ ID Nº: 46) DEDD, (SEQ ID Nº: 47) DEDG, (SEQ ID Nº: 48) AEDV, (SEQ ID Nº: 23) | P05067 |

| Proteína Amiloidogênica Humana | Sequência consenso | Número de acesso no Genbank |
|---|---|-----------------------------|
| proteína APP [Homo sapiens]. | EEDD, (SEQ ID Nº: 45) SEDK, (SEQ ID Nº: 46) DEDD, (SEQ ID Nº: 47) DEDG, (SEQ ID Nº: 48) | AAH65523 |
| proteína APP [Homo sapiens]. | EEDD, (SEQ ID Nº: 45) SEDK, (SEQ ID Nº: 46) DEDD, (SEQ ID Nº: 47) DEDG, (SEQ ID Nº: 48) | AAH04369 |
| proteína precursora amiloide beta (A4) (nexina-II protease, doença de Alzheimer) [Homo sapiens]. | EEDD, (SEQ ID Nº: 45) SEDK, (SEQ ID Nº: 46) DEDD, (SEQ ID Nº: 47) DEDG, (SEQ ID Nº: 48) AEDV, (SEQ ID Nº: 23) | AAW82435 |
| Calcitonina | SEDE, (SEQ ID Nº: 18) | AAA58403 |
| precursor de calcitonina | SEDE, (SEQ ID Nº: 18) | AAA35501 |
| pré-pró-calcitonina [Homo sapiens] | SEDE, (SEQ ID Nº: 18) | CAA25103 |
| pré-pró-calcitonina | SEDE, (SEQ ID Nº: 18) | AAA51913 |
| precursor de calcitonina [Contém: Calcitonina; Katacalcina (peptídeo carbóxi-terminal da Calcitonina) (CCP) (PDN-21)] | SEDE, (SEQ ID Nº: 18) | P01258 |
| calcitonina isoforma CALCA pré-pró-proteína [Homo sapiens]. | SEDE, (SEQ ID Nº: 18) | NP_001029124 |
| calcitonina isoforma CALCA pré-pró-proteína [Homo sapiens]. | SEDE, (SEQ ID Nº: 18) | NP_001732 |

| Proteína Amiloidogênica Humana | Sequência consenso | Número de acesso no Genbank |
|---|---|-----------------------------|
| calcitonina isoforma CGRP pré-pró-proteína [Homo sapiens]. | SEDE, (SEQ ID Nº: 18) | NP_001029125 |
| Precursor de peptídeo 1 relacionado ao gene da calcitonina (peptídeo I relacionado ao gene da calcitonina) (CGRP-I) (CGRP tipo Alfa). | SEDE, (SEQ ID Nº: 18) | P06881 |
| fator natriurético atrial | LEDE, (SEQ ID Nº: 49) | AAA35528 |
| pró-peptídeo de fator natriurético atrial [Homo sapiens]. | LEDE, (SEQ ID Nº: 49) | CAA25700 |
| fator natriurético atrial | LEDE, (SEQ ID Nº: 49) | 1101403A |
| Precursor de fator natriurético atrial (ANF) (Peptídeo natriurético atrial) (ANP) (Pré-pró-natriodilatina) (CDD-ANF) [Contém: Peptídeo relacionado à cardiodilatina (CDP)]. | LEDE, (SEQ ID Nº: 49) | P01160 |
| peptídeo natriurético atrial | LEDE, (SEQ ID Nº: 49) | AAA35529 |
| queratina [Homo sapiens] | GEDA, (SEQ ID Nº: 50) | AAB30058 |
| queratina [Homo sapiens]. | VEDF, (SEQ ID Nº: 51) YEDE, (SEQ ID Nº: 52) | CAA31695 |
| Queratina | IEDL, (SEQ ID Nº: 53) GEDA, (SEQ ID Nº: 50) | AAB59562 |
| Queratina, tipo II citoesquelética 6C (Citoqueratina-6C) (CK 6C) (K6c queratina) (Citoqueratina-6E) (CK 6E) (Queratina K6h). | VEDL, (SEQ ID Nº: 64) YEDE, (SEQ ID Nº: 52) LEDA, (SEQ ID Nº: 65) | P48668 |
| fibrinogênio [Homo sapiens] | WEDY, (SEQ ID Nº: 54) | CAA50740 |

| Proteína Amiloidogênica Humana | Sequência consenso | Número de acesso Genbank |
|--|---|--------------------------|
| subunidade alfa do precursor de fibrinogênio [Homo sapiens]. | DEDW, (SEQ ID Nº: 55) SEDL, (SEQ ID Nº: 56) YEDQ, (SEQ ID Nº: 57) SEDG, (SEQ ID Nº: 66) LEDW, (SEQ ID Nº: 58) | AAC97142 |
| cadeia alfa de fibrinogênio [Homo sapiens] | DEDW, (SEQ ID Nº: 55) SEDL, (SEQ ID Nº: 56) YEDQ, (SEQ ID Nº: 57) SEDG, (SEQ ID Nº: 66) | AAI01936 |
| cadeia alfa de fibrinogênio [Homo sapiens] | DEDW, (SEQ ID Nº: 55) SEDL, (SEQ ID Nº: 56) YEDQ, (SEQ ID Nº: 57) SEDG, (SEQ ID Nº: 66) | AAH98280 |
| cadeia alfa de fibrinogênio, isoforma CRA_b [Homo sapiens]. | DEDW, (SEQ ID Nº: 55) SEDL, (SEQ ID Nº: 56) YEDQ, (SEQ ID Nº: 57) SEDG, (SEQ ID Nº: 66) LEDW, (SEQ ID Nº: 58) | EAX04926 |
| cadeia alfa de fibrinogênio, isoforma CRA_c [Homo sapiens]. | DEDW, (SEQ ID Nº: 55) SEDL, (SEQ ID Nº: 56) YEDQ, (SEQ ID Nº: 57) SEDG, (SEQ ID Nº: 66) | EAX04928 |

| Proteína Amiloidogênica Humana | Sequência consenso | Número de acesso no Genbank |
|--|--|-----------------------------|
| cadeia alfa de fibrinogênio, isoforma CRA_a [Homo sapiens] | DEDW, (SEQ ID N°: 55) SEDL, (SEQ ID N°: 56) | EAX04924 |
| precursor de proteína príon; PRNP [Homo sapiens] | YEDR, (SEQ ID N°: 59) | AAC62750 |
| Precursor de proteína príon principal (PrP) (PrP27-30) (PrP33-35C) (ASCR) (CD230 antígeno) | YEDR, (SEQ ID N°: 59) | P04156 |
| pré-pró-proteína de proteína príon [Homo sapiens]. | YEDR, (SEQ ID N°: 59) | NP_000302 |
| prolactina [Homo sapiens] | PEDK, (SEQ ID N°: 60) | CAA38264 |
| Prolactina [Homo sapiens]. | PEDK, (SEQ ID N°: 60) | AAH88370 |

VI. Peptídeos Amiloides para Imunização Ativa

[000184] Agentes terapêuticos para uso nos métodos da invenção são peptídeos imunogênicos, tais como peptídeos AA e peptídeos AL, que na administração a um paciente geram anticorpos que se ligam especificamente a um ou mais epitopos compreendendo X_1EDX_2 , tal como, por exemplo, epitopos entre resíduos 70 a 76 de AA ("agentes AA"). Exemplos adicionais de agentes incluem peptídeos imunogênicos que compreendem um fragmento consistindo em X_1EDX_2 derivado de outras proteínas amiloides ("fragmentos de X_1EDX_2 "), tais como fragmentos V_k de AL consistindo da sequência de aminoácidos PEDI, (SEQ ID N°: 21), PEDF, (SEQ ID N°: 22), AEDV, (SEQ ID N°: 23), SEDF, (SEQ ID N°: 24), ou SEDA, (SEQ ID N°: 25), e fragmentos V_λ de AL consistindo da sequência de aminoácidos SEDE, (SEQ ID N°: 18), AEDE, (SEQ ID N°: 19), TEDE, (SEQ ID N°: 16) ou PEDE, (SEQ ID N°: 20). Um fragmento V_λ de AL consistindo da sequência de aminoácidos FEDD, (SEQ ID N°: 17) também pode ser usado. Algumas proteínas amiloides adequadas incluem Proteína amiloide A sérica, proteína da cadeia leve da imunoglobulina, polipeptídeo precursor amiloide de ilhota humana (IAPP), peptídeo

amiloide beta, transtiretina (TTR), ApoA1 e outras proteínas amiloides listadas na Tabela 1 e que compreendem a sequência X_1EDX_2 . Em alguns agentes X_1 é H, T, F, S, P, A ou qualquer outro resíduo de aminoácido precedendo imediatamente ED em uma proteína amiloide; e X_2 é T, S, E, R, I, V, F, D, A ou qualquer outro resíduo de aminoácido imediatamente após ED em tal proteína amiloide. Em alguns agentes, X_1 é H, T, F, S, P, ou A e X_2 é T, S, E, D, R, I, V, F ou A. Em tais agentes, quando X_1 é H, X_2 é T ou A; quando X_1 é A, X_2 é S, T, E ou V; quando X_1 é T, X_2 é E; quando X_1 é F, X_2 é D; quando X_1 é S, X_2 é E, F ou A; e quando X_1 é P, X_2 é E, I ou F. Em alguns agentes, X_1 é H, T, F, S, P, ou A e X_2 é T, S, E, D, R, I, V, F ou A, com a ressalva que se X_1 for A, X_2 não seja V. Em alguns agentes, quando X_1 é A, X_2 é S, T ou E.

[000185] Alguns agentes compreendem a sequência de aminoácidos GHEDT, (SEQ ID Nº: 3), HEDT, (SEQ ID Nº: 12), AEDS, (SEQ ID Nº: 13), AEDT, (SEQ ID Nº: 14), HEDA, (SEQ ID Nº: 15), TEDE, (SEQ ID Nº: 16), FEDD, (SEQ ID Nº: 17), SEDE, (SEQ ID Nº: 18), AEDE, (SEQ ID Nº: 19), PEDE, (SEQ ID Nº: 20), PEDI, (SEQ ID Nº: 21), PEDF, (SEQ ID Nº: 22), AEDV, (SEQ ID Nº: 23), SEDF, (SEQ ID Nº: 24) ou SEDA, (SEQ ID Nº: 25). Alguns agentes consistem de uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em GHEDT, (SEQ ID Nº: 3), HEDT, (SEQ ID Nº: 12), AEDS, (SEQ ID Nº: 13), AEDT, (SEQ ID Nº: 14), HEDA, (SEQ ID Nº: 15), TEDE, (SEQ ID Nº: 16), FEDD, (SEQ ID Nº: 17), SEDE, (SEQ ID Nº: 18), AEDE, (SEQ ID Nº: 19), PEDE, (SEQ ID Nº: 20), PEDI, (SEQ ID Nº: 21), PEDF, (SEQ ID Nº: 22), AEDV, (SEQ ID Nº: 23), SEDF, (SEQ ID Nº: 24), ou SEDA, (SEQ ID Nº: 25), ligada a um veículo para formar um conjugado. Alguns agentes compreendem a sequência de aminoácidos GHEDT, (SEQ ID Nº: 3), HEDT, (SEQ ID Nº: 12), AEDS, (SEQ ID Nº: 13), AEDT, (SEQ ID Nº: 14), HEDA, (SEQ ID Nº: 15), TEDE, (SEQ ID Nº: 16),

FEDD, (SEQ ID Nº: 17), SEDE, (SEQ ID Nº: 18), AEDE, (SEQ ID Nº: 19), PEDE, (SEQ ID Nº: 20), PEDI, (SEQ ID Nº: 21), PEDF, (SEQ ID Nº: 22), AEDV, (SEQ ID Nº: 23), SEDF, (SEQ ID Nº: 24) ou SEDA, (SEQ ID Nº: 25). Alguns agentes consistem de uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em GHEDT, (SEQ ID Nº: 3, HEDT, (SEQ ID Nº: 12), AEDS, (SEQ ID Nº: 13), AEDT, (SEQ ID Nº: 14), HEDA, (SEQ ID Nº: 15), TEDE, (SEQ ID Nº: 16), FEDD, (SEQ ID Nº: 17), SEDE, (SEQ ID Nº: 18), AEDE, (SEQ ID Nº: 19), PEDE, (SEQ ID Nº: 20), PEDI, (SEQ ID Nº: 21), PEDF, (SEQ ID Nº: 22), SEDF, (SEQ ID Nº: 24) e SEDA, (SEQ ID Nº: 25), ligada a um veículo para formar um conjugado. Alguns agentes compreendem a sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em GHEDT, (SEQ ID Nº: 3, HEDT, (SEQ ID Nº: 12), AEDS, (SEQ ID Nº: 13), AEDT, (SEQ ID Nº: 14), HEDA, (SEQ ID Nº: 15) e TEDE, (SEQ ID Nº: 16).

[000186] Fragmentos AA preferenciais são resíduos 70 a 76 da isoforma alfa de AA1 humana (HAA1) (GHGAEDS, SEQ ID Nº:4), resíduos 70 a 76 da isoforma beta de HAA1 (GHDAEDS, SEQ ID Nº:5), resíduos 70 a 76 da isoforma gama de HAA1 (GHDAEDS, SEQ ID Nº: 5), e resíduos 70 a 76 das isoformas alfa e beta de HAA2 (GHGAEDS, SEQ ID Nº: 4), resíduos 70 a 76 de HAA3 (GDHAEDS, SEQ ID Nº:7), resíduos 78 a 84 de HAA4 (STVIEDS, SEQ ID Nº:8), resíduos 69 a 75 de AA1 de camundongo (MAA1) (GRGHEDT, SEQ ID Nº:9), resíduos 69 a 75 de MAA2 (GRGHEDT, SEQ ID Nº: 9), resíduos 62 a 68 de MAA3 (GHGAEDS, SEQ ID Nº:10) e resíduos 76 a 82 de MAA4 (NHGLETL, SEQ ID Nº:11) ou subfragmentos de pelo menos três aminoácidos contíguos de algum destes. Alguns fragmentos AA não contêm resíduo de um peptídeo de amiloidose AA além do segmento indicado acima. Outros fragmentos AA contêm resíduos flanqueadores adicionais de um peptídeo de amiloidose AA,

mas contêm não mais do que 20 ou preferencialmente não mais do que 10 resíduos contíguos em total de um peptídeo de amiloidose AA. Fragmentos X_1EDX_2 e AL preferenciais adicionais incluem GHEDT, (SEQ ID N°: 3), HEDT, (SEQ ID N°: 12), AEDS, (SEQ ID N°: 13), AEDT, (SEQ ID N°: 14), HEDA, (SEQ ID N°: 15), e TEDE, (SEQ ID N°: 16).

[000187] Agentes terapêuticos para uso nos métodos da invenção também incluem peptídeos AA imunogênicos que na administração a um paciente geram anticorpos que se ligam especificamente a epitopos N-terminais de AA. Agentes preferenciais induzem uma resposta imunogênica direcionada a um epitopo nos resíduos 1 a 15 de AA humana.

[000188] Preferencialmente, o fragmento de AA ou AL ou outros agentes, tais como fragmentos de X_1EDX_2 administrados na falta de um epitopo que geraria uma resposta de célula T ao fragmento. Geralmente, epitopos de célula T são maiores do que 10 aminoácidos contíguos. Por isso, fragmentos preferenciais de proteínas amiloides, tais como fragmentos AA ou X_1EDX_2 têm tamanho de 4 a 10 ou preferencialmente de 7 a 10 aminoácidos contíguos; isto é, comprimento suficiente para gerar uma resposta ao anticorpo sem gerar uma resposta de célula T. Ausência de epitopos de célula T é preferencial porque estes epitopos não são necessários para atividade imunogênica de fragmentos, e podem causar uma resposta inflamatória indesejada em um subconjunto de pacientes (Anderson et al., (2002) *J. Immunol.* 168, 3697-3701; Senior (2002) *Lancet Neurol.* 1, 3).

[000189] Fragmentos AA preferenciais são resíduos 70 a 76 da isoforma alfa de AA1 humana (HAA1) (GHGAEDS) (SEQ ID N°: 4), resíduos 70 a 76 da isoforma beta de HAA1 (GHDAEDS) (SEQ ID N°:5), resíduos 70 a 76 da isoforma gama de HAA1 (GHDAEDS, SEQ

ID Nº: 5), resíduos 70 a 76 das isoformas alfa e beta de HAA2 (GHGAEDS, SEQ ID Nº: 4), resíduos 70 a 76 de HAA3 (GDHAEDS) (SEQ ID Nº:7), resíduos 78 a 84 de HAA4 (STVIEDS) (SEQ ID Nº:8), resíduos 69 a 75 de AA1 de camundongo (MAA1) (GRGHEDT) (SEQ ID Nº:9), resíduos 69 a 75 de MAA2 (GRGHEDT, SEQ ID Nº: 9), resíduos 62 a 68 de MAA3 (GHGAEDS) (SEQ ID Nº:10) e resíduos 76 a 82 de MAA4 (NHGLETL) (SEQ ID Nº:11) ou subfragmentos de pelo menos três aminoácidos contíguos de algum destes. Alguns fragmentos AA não contêm resíduos de um peptídeo de amiloidose AA além do segmento indicado acima. Outros fragmentos AA contêm resíduos flanqueadores adicionais de um peptídeo de amiloidose AA, mas contêm não mais do que 20 ou preferencialmente não mais do que 10 resíduos contíguos no total de um peptídeo de amiloidose AA. Fragmentos X_1EDX_2 e AL adicionais preferenciais incluem GHEDT, (SEQ ID Nº: 3), HEDT, (SEQ ID Nº: 12), AEDS, (SEQ ID Nº: 13), AEDT, (SEQ ID Nº: 14), HEDA, (SEQ ID Nº: 15) e TEDE, (SEQ ID Nº: 16).

[000190] Análogos de amiloidose AA natural, amiloidose AL, e outros peptídeos de amiloidose também podem ser usados para induzir uma resposta imune nos métodos e nas composições da invenção. Análogos incluindo espécies alélicas e variantes induzidas. Análogos de AA induzem anticorpos que se ligam especificamente com um peptídeo AA 70-76 natural. Tais análogos falham em induzir anticorpos que se ligam especificamente a epitopos fora de AA70-76. Análogos de AA tipicamente diferenciam-se de peptídeos de ocorrência natural em até 30% das posições de aminoácido por até 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 modificações de posição. Cada deleção ou substituição de um resíduo de aminoácido natural é considerada uma modificação de posição como é a inserção de um resíduo sem substituição. Substituições de aminoácidos são substituições muitas vezes

conservativas.

[000191] Alguns análogos de AA ou fragmentos de AA ou fragmentos de AL ou AL ou outros fragmentos de proteína amiloide, tais como fragmentos de X_1EDX_2 também incluem aminoácidos não naturais ou modificações de aminoácidos N ou C terminais em um, dois, cinco, dez ou até todas as posições. Por exemplo, o resíduo ácido aspártico natural pode ser substituído com ácido isoaspártico. Exemplos de aminoácidos não naturais são D, alfa, aminoácidos alfadissubstituídos, aminoácidos N-alquila, ácido láctico, 4-hidroxiprolina, gama-carboxiglutamato, epsilon-N,N,N-trimetilisina, epsilon-N-acetilisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metil-histidina, 5-hidroxilisina, omega-N-metilarginina, β -alanina, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, tiroxina, ácido gama-aminobutírico, homoserina, citrulina e ácido isoaspártico. Alguns agentes terapêuticos da invenção são peptídeos todo-D, por exemplo, AA todo-D ou fragmentos AA todo-D, e análogos peptídicos todo-D. Alguns agentes terapêuticos da invenção são 90% peptídeos todo-D, por exemplo, 90% AA todo-D ou 90% fragmentos AA todo-D, e 90% de análogos peptídicos todo-D. Alguns agentes terapêuticos da invenção são 80% de peptídeos todo-D, por exemplo, 80% AA todo-D ou 80% de fragmentos AA todo-D, e 80% análogos peptídicos todo-D. Fragmentos e análogos podem ser rastreados para eficácia profilática ou terapêutica em modelos animais transgênicos em comparação com controles não tratado ou placebo como descrito abaixo.

[000192] AA, AL, seus fragmentos, e análogos e fragmentos X_1EDX_2 e seus análogos podem ser sintetizados por síntese peptídica em fase sólida ou expressão recombinante, ou podem ser obtidos de fontes naturais. Sintetizadores de peptídeo automáticos estão comercialmente disponíveis em numerosos fornecedores, tais como Applied Biosystems, Foster City, Califórnia. A expressão recombinante

pode ser em bactérias, tais como E. coli, levedura, células de inseto ou células mamíferas. Procedimentos da expressão recombinante são descritos por Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (C.S.H.P. Press, NY 2d ed., 1989.)

[000193] Agentes terapêuticos também incluem polipeptídeos mais longos que incluem, por exemplo, um fragmento imunogênico de peptídeo AA, peptídeo AL ou um fragmento de X_1EDX_2 , em conjunto com um ou mais aminoácidos que flanqueiam o peptídeo AA, peptídeo AL ou fragmento de X_1EDX_2 em um ou um ou ambos os lados. Por exemplo, agentes preferenciais incluem proteínas de fusão compreendendo um segmento de AA, AL ou fragmento de X_1EDX_2 fusionado a uma sequência de aminoácidos heteróloga que induz uma resposta de célula T auxiliar contra a sequência de aminoácidos heteróloga e por meio disso uma resposta de célula B contra o segmento de AA, segmento de AL ou fragmento de X_1EDX_2 . Um ou mais aminoácidos heterólogos flanqueadores também podem ser usados para cobrir um peptídeo AA ou AL ou fragmento de X_1EDX_2 para protegê-lo da degradação na produção, armazenamento ou uso. Tais polipeptídeos podem ser rastreados para eficácia profilática ou terapêutica em modelos animais em comparação com controles não tratados ou placebo como descrito abaixo. Agentes terapêuticos da invenção incluem um fragmento imunogênico de AA ou AL ou fragmento de X_1EDX_2 flanqueado de sequências de polilisina. As sequências de polilisina podem ser fusionadas ao N-terminal, ao C terminal, ou tanto N- como C-terminal de AA ou AL ou um fragmento imunogênico de AA ou AL ou fragmento de X_1EDX_2 . O peptídeo AA ou AL, fragmento de X_1EDX_2 , análogo, fragmento ativo de AA ou outro polipeptídeo podem ser administrados em forma associada ou multimérica ou em forma dissociada. Agentes terapêuticos também incluem multímeros de agentes imunogênicos monoméricos.

[000194] Em uma variação adicional, um fragmento imunogênico de AA ou AL ou fragmento de X_1EDX_2 podem ser apresentados por um vírus ou uma bactéria como parte de uma composição imunogênica. Um ácido nucleico que codifica o peptídeo imunogênico é incorporado em um genoma ou epissoma de vírus ou bactérias. Opcionalmente, o ácido nucleico é incorporado de tal maneira que o peptídeo imunogênico é expresso como uma proteína secretada ou como uma proteína de fusão com uma proteína de superfície externa de um vírus ou uma proteína transmembrana de uma bactéria para que o peptídeo seja exposto. Vírus ou bactérias usados em tais métodos devem ser não patogênicos ou atenuados. Vírus adequados incluem adenovírus, HSV, vírus de encefalite equina venezuelana e outros vírus alfa, vírus de estomatite vesicular, e outros vírus rabdo, vacínia e varíola aviária. Bactérias adequadas incluem Salmonella e Shigella. Fusão de um peptídeo imunogênico a HBsAg de HBV é particularmente adequada.

[000195] Agentes terapêuticos também incluem peptídeos e outros compostos que não necessariamente têm uma similaridade de sequência de aminoácidos significativa com AA ou AL ou fragmento de X_1EDX_2 , mas no entanto servem como miméticos de AA ou AL ou fra

[000196] gmento de X_1EDX_2 e induzem uma resposta imune similar. Por exemplo, quaisquer peptídeos e proteínas formando folhas β dobradas podem ser rastreadas para conveniência. Anticorpos anti-idiotípicos contra anticorpos monoclonais para AA ou AL ou outros peptídeos amiloidogênicos tais como ou fragmentos X_1EDX_2 também podem ser usados. Tais anticorpos anti-Id mimetizam o antígeno e geram uma resposta imune a ele (ver Essential Immunology (Roit ed., Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, 6th ed.), p. 181). Agentes além de peptídeos AA devem induzir uma resposta imunogênica contra um ou mais dos segmentos preferenciais de AA listados acima (por exemplo, AA70-76 ou GHEDT, (SEQ ID N°: 3) ou AL ou fragmento

de X_1EDX_2 listados acima, tais como, por exemplo, HEDT, (SEQ ID N°: 12), AEDS, (SEQ ID N°: 13), AEDT, (SEQ ID N°: 14), HEDA, (SEQ ID N°: 15) e TEDE, (SEQ ID N°: 16).

[000197] Preferencialmente, tais agentes induzem uma resposta imunogênica que é especificamente direcionada a um destes segmentos sem ser direcionada a outros segmentos de AA ou AL ou proteína amiloide da qual o fragmento de X_1EDX_2 foi derivado.

[000198] As bibliotecas randômicas de peptídeos ou outros compostos também podem ser rastreadas para conveniência. Bibliotecas combinatórias podem ser produzidas para muitos tipos de compostos que podem ser sintetizados de uma maneira gradual. Tais compostos incluem polipeptídeos, miméticos de ligações entre folhas beta, polissacarídeos, fosfolipídeos, hormônios, prostaglandina, esteroides, compostos aromáticos, compostos heterocíclicos, benzodiazepinas, glicinas oligoméricas N-substituídas e oligocarbamatos. Grandes bibliotecas combinatórias dos compostos podem ser construídas pelas bibliotecas sintéticas codificadas (ESL) método descrito em Affymax, WO 95/12608, Affymax, WO 93/06121, universidade de Columbia, WO 94/08051, Farmacopéia, WO 95/35503 e Scripps, WO 95/30642 (cada um dos quais é incorporado por referência para todos os fins). Bibliotecas peptídicas também podem ser geradas por métodos de exposição de fago. Ver, *por exemplo*, Devlin, WO 91/18980.

[000199] Bibliotecas combinatórias e outros compostos são inicialmente rastreados para conveniência pela determinação de sua capacidade de ligar-se especificamente a anticorpos ou linfócitos (B ou T) conhecidos por serem específicos para AA ou outros peptídeos amiloidogênicos. Por exemplo, rastreamentos iniciais podem ser realizados com qualquer anticorpo policlonal ou monoclonal sérico a AA ou AL ou um fragmento do mesmo ou a um fragmento de X_1EDX_2 .

Os compostos podem então ser rastreados para ligação específica a um epitopo específico dentro de AA (por exemplo, AA70-76 ou GHEDT, (SEQ ID Nº: 3) ou AL ou a um fragmento de X₁EDX₂ listado acima, tal como, por exemplo, HEDT, (SEQ ID Nº: 12), AEDS, (SEQ ID Nº: 13), AEDT, (SEQ ID Nº: 14), HEDA, (SEQ ID Nº: 15) e TEDE, (SEQ ID Nº: 16).

[000200] Os compostos podem ser testados pelos mesmos procedimentos descritos para mapear as especificidades do anticorpo para epitopo. Os compostos identificados por tais rastreamentos então são analisados ainda para a capacidade de induzir anticorpos ou linfócitos reativos a AA ou AL ou fragmentos dos mesmos ou a um fragmento de X₁EDX₂. Por exemplo, diluições múltiplas de soro podem ser testadas em placas de microtítulo que foram pré-cobertas de AA ou AL ou um fragmento do mesmo ou um fragmento de X₁EDX₂ e um ELISA-padrão pode ser realizado para teste de anticorpos reativos a AA ou AL ou o fragmento ou ao fragmento de X₁EDX₂. Os compostos então podem ser testados para eficácia profilática e terapêutica em animais transgênicos predispostos a amiloidose, tais como, por exemplo, Amiloidose AA ou amiloidose AL. A mesma abordagem de rastreamento pode ser usada em outros agentes potenciais, análogos de AA, análogos de AL e peptídeos mais longos, incluindo fragmentos AA, AL e fragmentos X₁EDX₂, descritos acima.

VII. Conjugados

[000201] Alguns agentes para induzir uma resposta imune contêm o epitopo apropriado para induzir uma resposta imune contra AA, mas são muito pequenos para serem imunogênicos. Nesta situação, um imunógeno peptídico pode ser ligado a uma molécula veículo-veículo adequada para formar um conjugado que ajuda a provocar uma resposta imune. Um agente único pode ser ligado a um veículo único, múltiplas cópias de um agente podem ser ligadas a múltiplas cópias de

um veículo, que são por sua vez ligadas entre si, múltiplas cópias de um agente podem ser ligadas a uma cópia única de um veículo, ou uma cópia única de um agente pode ser ligada a múltiplas cópias de um veículo, ou veículos diferentes. Veículos adequados incluem albuminas séricas, hemocianina de keyhole limpet, moléculas de imunoglobulina, tiroglobulina, ovalbumina, tétano toxoide, ou um toxoide de outras bactérias patogênicas, tais como difteria, *E. coli*, cólera, ou *H. pylori*, ou um derivado de toxina atenuada. Epitopos de células T são também moléculas de veículo adequadas. Alguns conjugados podem ser formados pela ligação dos agentes da invenção a uma molécula polimérica imunoestimulatória (*por exemplo*, tripalmitoil-S-glicerina cisteína (Pam₃Cys), manana (um polímero de manose), ou glicano (um polímero beta 1→2)), citocinas (*por exemplo*, IL-1, IL-1 alfa e peptídeos-beta, IL-2, INF gama, IL-10, GM-CSF), e quimiocinas (*por exemplo*, MIP1alfa e beta, e RANTES). Agentes imunogênicos também podem ser ligados a peptídeos que aumentam o transporte através de tecidos, como descrito em O'Mahony, WO 97/17613 e WO 97/17614. Os imunógenos podem ser ligados aos veículos com ou sem aminoácidos espaçadores externos (*por exemplo*, gly-gly).

[000202] Alguns conjugados podem ser formados pela ligação de agentes da invenção a pelo menos um epitopo de célula T. Alguns epitopos de células T são promíscuos enquanto outros epitopos de células T são universais. Epitopos de células T promíscuos são capazes de aumentar a indução da imunidade de célula T em uma larga variedade de indivíduos exibindo vários tipos de HLA. Em contraste com epitopos de células T promíscuos, os epitopos de células T universais são capazes de aumentar a indução da imunidade de célula T em uma grande porcentagem, *por exemplo*, pelo menos 75%, de indivíduos exibindo várias moléculas de HLA codificadas por

alelos de HLA-DR diferentes.

[000203] Um grande número de epitopos de célula T de ocorrência natural existe, tal como, tétano toxoide (por exemplo, os epitopos P2 e P30), antígeno de superfície de Hepatite B, coqueluche, toxoide, proteína F de vírus de sarampo, proteína principal de membrana externa de *Chlamydia trachomatis*, difteria toxoide (por exemplo, CRM197), circumsporozoíto T de *Plasmodium falciparum*, antígeno CS de *Plasmodium falciparum*, triose fosfato isomerase de *Schistosoma mansoni*, TraT de *Escherichia coli* e hemaglutinina de vírus de Influenza (HA). Peptídeos imunogênicos da invenção também podem ser conjugados aos epitopos de célula T descritos em Sinigaglia F. et al., *Nature*, 336:778-780 (1988); Chicz R.M. et al., *J. Exp. Med.*, 178:27-47 (1993); Hammer J. et al., *Cell* 74:197-203 (1993); Falk K. et al., *Immunogenetics*, 39:230-242 (1994); WO 98/23635; Southwood S. et al. *J. Immunology*; 160:3363-3373 (1998); e, Giannini, G. et al. *Nucleic Acids Res.* 12: 4063-4069 (1984), (cada um dos quais é incorporado neste pedido por referência para todos os fins). Exemplos adicionais incluem:

Hemaglutinina de Influenza: HA₃₀₇₋₃₁₉

CS de Malária: epitopo T3 EKKIAKMEKASSVFNV, (SEQ ID N^o: 67).

Antígeno de superfície Hepatite B: HBsAg₁₉₋₂₈ FFLLTRILTI, (SEQ ID N^o: 68).

Proteína de Choque Térmico 65: hsp65₁₅₃₋₁₇₁ DQSIGDLIAEAMDKVGNEG, (SEQ ID N^o: 69).

bacilo Calmette-Guerin QVHFQPLPPAVVKL, (SEQ ID N^o: 70).

Tétano toxoide: TT₈₃₀₋₈₄₄ QYIKANSKFIGITEL, (SEQ ID N^o: 71).

Tétano toxoide: TT₉₄₇₋₉₆₇ FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE,

(SEQ ID Nº: 72).

gp120 de HIV T1: KQIINMWQEVGKAMYA, (SEQ ID Nº: 73).

Tétano toxoide: TT₉₄₇₋₉₆₇ FNNFTVSFWLRVPSKVSASHLE

gp120 de HIV T1: KQIINMWQEVGKAMYA.

[000204] Alternativamente, os conjugados podem ser formados pela ligação dos agentes da invenção a pelo menos um epitopo de célula T artificial capaz de ligar-se a uma grande proporção de moléculas MHC da Classe II, tais como a epitopo pan DR ("PADRE"). PADRE é descrito em US 5.736.141, WO 95/07707, e Alexander J et al., *Immunity*, 1:751-761 (1994) (cada um dos quais é incorporado neste pedido por referência para todos os fins). Um peptídeo PADRE preferencial é **AKXVAAWTLKAAA**, (SEQ ID Nº: 74), (resíduos comuns em negrito) em que X é preferencialmente ciclo-hexilalanina, tirosina ou fenilalanina, com ciclo-hexilalanina sendo mais preferencial.

[000205] Agentes imunogênicos podem ser ligados a veículos por interligação química. Técnicas para ligação de um imunógeno a um veículo incluem a formação de ligações dissulfeto usando n-succinimidil-3-(2-piridil-tio) propionato (SPDP) e succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclo-hexano-1-carboxilato (SMCC) (se o peptídeo necessitar de um grupo sulfidril, este pode ser fornecido pela adição de um resíduo cisteína). Estes reagentes criam uma ligação dissulfeto entre eles e o peptídeo cisteína reside em uma proteína e uma ligação amida através da epsilon-amino em uma lisina, ou outro grupo amino livre em outros aminoácidos. Uma variedade de tais agentes formadores dissulfeto/amida é descrita por *Immun. Rev.* 62, 185 (1982). Outros agentes de acoplamento bifuncionais formam um tioéter em vez de uma ligação dissulfeto. Muitos destes agentes formadores tio-éter estão comercialmente disponíveis e incluem ésteres reativos de ácido 6-maleimidocaproico, ácido 2-bromoacético,

e ácido 2-iodoacético, ácido 4-(N-maleimido-metil)ciclo-hexano-1-carboxílico. Os grupos carboxila podem ser ativados pela sua combinação com sal sódico de succinimida ou ácido 1-hidroxil-2-nitro-4-sulfônico.

[000206] A imunogenicidade pode ser melhorada através da adição de resíduos espaçadores (por exemplo, Gly-Gly) entre o epítipo T_h e o imunógeno peptídico da invenção. Além de separar fisicamente o epítipo T_h do epítipo de célula B (isto é, o imunógeno peptídico), os resíduos glicina podem interromper quaisquer estruturas secundárias artificiais criadas pela junção do epítipo T_h com o imunógeno peptídico, e por meio disso eliminar a interferência entre as respostas de célula T e/ou B. A separação conformacional entre o epítipo auxiliar e o domínio de produção de anticorpo dessa forma permite interações mais eficientes entre o imunógeno apresentado e as células T_h e B apropriadas.

[000207] Para aumentar a indução da imunidade de célula T em uma grande porcentagem de indivíduos exibindo vários tipos de HLA a um agente da presente invenção, uma mistura de conjugados com epítipos celulares T_h diferentes pode ser preparada. A mistura pode conter uma mistura de pelo menos dois conjugados com epítipos de célula T_h diferentes, uma mistura de pelo menos três conjugados com epítipos de célula T_h diferentes, ou uma mistura de pelo menos quatro conjugados com epítipos de célula T_h diferentes. A mistura pode ser administrada com um adjuvante.

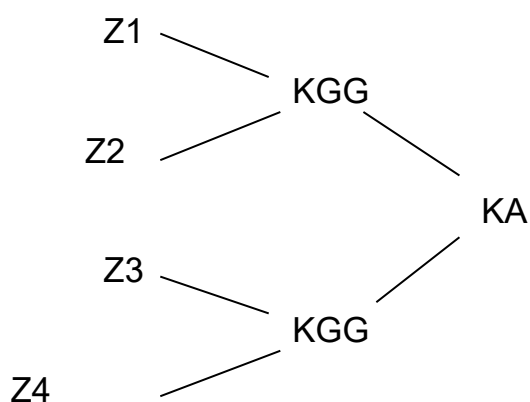
[000208] Peptídeos imunogênicos também podem ser expressos como proteínas de fusão com veículos (isto é, peptídeos heterólogos). O peptídeo imunogênico pode ser ligado em seu terminal amino, seu terminal carboxila, ou ambos a um veículo. Opcionalmente, múltiplas repetições do peptídeo imunogênico podem estar presentes na proteína de fusão. Opcionalmente, um peptídeo imunogênico pode ser

ligado a múltiplas cópias de um peptídeo heterólogo, por exemplo, em ambos terminais N e C do peptídeo. Opcionalmente, múltiplas cópias de um peptídeo imunogênico podem ser ligadas a múltiplas cópias de um peptídeo heterólogo que são ligados entre si. Alguns peptídeos veículos servem para induzir uma resposta de célula T auxiliar contra o peptídeo veículo. As células T auxiliares induzidas por sua vez induzem uma resposta de célula B contra o peptídeo imunogênico ligado ao veículo.

[000209] Alguns exemplos de proteínas de fusão adequadas para uso na invenção são mostrados abaixo. Algumas destas proteínas de fusão compreendem segmentos de AA ligados aos epitopos de tétano toxoide tal como descrito em US 5.196.512, EP 378.881 e EP 427.347. Algumas proteínas de fusão compreendem segmentos de AA ligados a pelo menos um peptídeo PADRE descrito em US 5.736.142. Alguns peptídeos heterólogos são epitopos de célula T promíscuos, enquanto outros peptídeos heterólogos são epitopos de célula T universais. Em alguns métodos, o agente de administração é simplesmente uma proteína de fusão única com um segmento de AA ligado a um segmento heterólogo em configuração linear. Os agentes terapêuticos da invenção podem ser representados usando uma fórmula. Por exemplo, em alguns métodos, o agente é multímero de proteínas de fusão representadas pela fórmula 2^x , em que x é um número inteiro de 1 a 5. Preferencialmente x é 1, 2 ou 3, com 2 sendo o mais preferencial. Quando x é dois, tal multímero tem quatro proteínas de fusão ligadas em uma configuração preferencial referida como MAP4 (ver US 5.229.490).

[000210] A configuração MAP4 é mostrada abaixo, onde as estruturas ramificadas são produzidas pelo início da síntese peptídica tanto nas aminas de cadeia terminais como em N laterais da lisina. Dependendo do número de vezes, a lisina é incorporada na sequência

e permitida ramificar, a estrutura resultante apresentará múltiplos terminais N. Neste exemplo, quatro terminais N idênticos foram produzidos no núcleo ramificado que contém a lisina. Tal multiplicidade aumenta muito a sensibilidade de células B cognatas. Nos exemplos abaixo, Z refere-se a um fragmento imunogênico de AA, AL ou um fragmento de X_1EDX_2 , e Z1 a 4 refere-se ao fragmento(s) imunogênico de AA, AL ou um fragmento de X_1EDX_2 . Os fragmentos podem ser os mesmos entre si ou diferentes.



[000211] Outros exemplos de proteínas de fusão incluem:

Z-tétano toxoide 830 a 844 em uma configuração MAP4:

Z-QYIKANSKFIGITEL, (SEQ ID Nº: 71)

Z-tétano toxoide 947 a 967 em uma configuração MAP4:

Z-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE, (SEQ ID Nº: 72)

Z-tétano toxoide 830 a 844 em uma configuração MAP4:

Z-QYIKANSKFIGITEL, (SEQ ID Nº: 71)

Z-tétano toxoide 830 a 844 + 947 a 967 em uma configuração linear:

Z-QYIKANSKFIGITELFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE,
(SEQ ID Nº: 75).

[000212] Peptídeo PADRE (todos em configurações lineares), em que X é preferencialmente ciclo-hexilalanina, tirosina ou fenilalanina, com ciclo-hexilalanina sendo o **-Z** mais preferencial:

AKXVAAWTLKAAA-**Z**, (SEQ ID Nº: 74).

Z x 3-peptídeo PADRE:

Z- ovalbumina 323 a 339 em uma configuração linear:

Z-ISQAVHAAHAEINEAGR, (SEQ ID Nº: 76).

Exemplos adicionais de proteínas de fusão incluem:

AKXVAAWTLKAAA-Z-Z-Z-Z, (SEQ ID Nº: 74).

Z-AKXVAAWTLKAAA, (**Z**-(SEQ ID Nº: 74).

PKYVKQNTLKLAT-Z-Z-Z, (SEQ ID Nº: 77).

Z-PKYVKQNTLKLAT-Z, (SEQ ID Nº: 77).

Z-Z-Z-PKYVKQNTLKLAT, (SEQ ID Nº: 77).

Z-Z-PKYVKQNTLKLAT, (**Z-Z**-(SEQ ID Nº: 77)

Z-PKYVKQNTLKLAT-EKKIAKMEKASSVFNV-

QYIKANSKFIGITEL-

FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE - (SEQ ID Nº: 78)

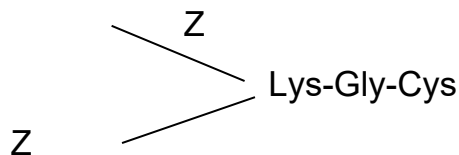
Z-Z-Z-QYIKANSKFIGITEL-

FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE, (SEQ ID Nº: 79).

Z-QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-Z,
(SEQ ID Nº: 79).

QYIKANSKFIGITELCFNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-Z,
(SEQ ID Nº: 79)

Z-QYIKANSKFIGITEL, (SEQ ID Nº: 71) em uma resina 2
ramificada: fragmentos pode ser os mesmos entre si ou diferentes.



[000213] As mesmas ou similares proteínas veículo e métodos da ligação podem ser usados para gerar imunógenos a serem usados na geração de anticorpos contra AA ou um fragmento imunogênico de AA, AL ou um fragmento de X₁EDX₂. Por exemplo, um fragmento imunogênico de AA ou AA, AL ou um fragmento de X₁EDX₂ ligado a um veículo pode ser administrado a um animal de laboratório na

produção de anticorpos monoclonais para AA ou um fragmento imunogênico de AA, AL ou um fragmento de X₁EDX₂.

VIII. Ácido Nucleico que Codifica Agentes Terapêuticos

[000214] Os agentes terapêuticos da invenção também incluem ácidos nucleicos. Respostas imunes contra depósitos amiloides também podem ser induzidas pela administração de ácidos nucleicos que codificam segmentos do peptídeo AA, e fragmentos dos mesmos, outros imunógenos peptídicos, tais como fragmentos de X₁EDX₂, ou anticorpos e suas cadeias componentes, tais como anticorpos 2A4, 8G9 e 7D8, usadas para imunização passiva. Tais agentes para uso nos métodos da invenção incluem ácidos nucleicos que codificam peptídeos AA que na administração a um paciente geram anticorpos que se ligam especificamente a um ou mais epitopos entre os resíduos 70 a 76 de AA, AL ou ácidos nucleicos que codificam peptídeos compreendendo fragmentos de X₁EDX₂. Tais agentes para uso nos métodos da invenção também incluem ácidos nucleicos que codificam anticorpos que se ligam especialmente a um neoepitopo do C-terminal de AA ou a X₁EDX₂. Em particular, tais ácidos nucleicos codificam anticorpos que se ligam especificamente a isoforma alfa de HAA1 nos resíduos 70 a 76 (GHGAEDS, (SEQ ID N^o: 4), isoforma beta de HAA1 nos resíduos 70 a 76 (GHDAEDS, (SEQ ID N^o: 5), isoforma gama de HAA1 nos resíduos 70 a 76 (GHDAEDS, (SEQ ID N^o: 5), isoformas alfa e beta de HAA2 nos resíduos 70 a 76 (GHGAEDS, (SEQ ID N^o: 4), HAA3 nos resíduos 70 a 76 (GDHAEDS, (SEQ ID N^o: 7), HAA4 nos resíduos 78 a 84 (STVIEDS, (SEQ ID N^o: 8), AA1 de camundongo (MAA1) nos resíduos 69 a 75 (GRGHEDT, (SEQ ID N^o: 9), MAA2 nos resíduos 69 a 75 (GRGHEDT, (SEQ ID N^o: 9), MAA3 nos resíduos 62 a 68 (GHGAEDS, (SEQ ID N^o: 4), e MAA4 nos resíduos 76 a 82 (NHGLETL, (SEQ ID N^o: 11). Tais ácidos nucleicos podem ser DNA ou RNA. Ácidos nucleicos preferenciais adicionais codificam anticorpos

que se ligam especificamente a HEDT, (SEQ ID Nº: 12), AEDS, (SEQ ID Nº: 13), AEDT, (SEQ ID Nº: 14), HEDA, (SEQ ID Nº: 15) ou TEDE, (SEQ ID Nº: 16) ou outros peptídeos X_1EDX_2 listados acima. Um segmento de ácido nucleico que codifica um imunógeno é tipicamente ligado a elementos reguladores, tal como um promotor e potencializador, que permitem a expressão do segmento de DNA nas células alvo desejadas de um paciente. Para expressão em células sanguíneas, como é desejável para a indução de uma resposta imune, elementos promotores e potencializadores de genes da cadeia leve ou pesada da imunoglobulina ou o principal promotor e potencializador precoce intermediário CMV são adequados para dirigir a expressão. Os elementos regulatórios ligados e sequências de codificação muitas vezes são clonados em um vetor. Para administração de anticorpos de cadeia dupla, as duas cadeias podem ser clonadas nos mesmos vetores ou separadas. Ácidos nucleicos que codificam os agentes terapêuticos da invenção também podem codificar pelo menos um epítipo de célula T. As revelações neste pedido que se relacionam ao uso de adjuvantes e ao uso de veículos aplicam mutatis mutandis ao seu uso com ácidos nucleicos que codificam os agentes terapêuticos da presente invenção.

[000215] Diversos sistemas de vetor viral estão disponíveis incluindo sistemas retrovirais (ver, por exemplo, Lawrie and Tumin, *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3, 102-109 (1993)); vetores adenovirais (ver, por exemplo, Bett et al., *J. Virol.* 67, 5911 (1993)); vetores virais adeno-associados (ver, por exemplo, Zhou et al., *J. Exp. Med.* 179, 1867 (1994)), vetores virais da família de varíola incluindo o vírus de vacínia e os vírus de varíola aviária, vetores virais do gênero de vírus alfa, tais como os derivados de Sindbis e Vírus Florestais Semliki (ver, por exemplo, Dubensky et al., *J. Virol.* 70, 508-519 (1996)), vírus da encefalite equina venezuelana (ver US 5.643.576) e rabdovírus, tais

como vírus de estomatite vesicular (ver WO 96/34625) e papilomavírus (Ohe et al., *Human Gene Therapy* 6, 325-333 (1995); Woo et al., WO 94/12629 e Xiao & Brandsma, *Nucleic Acids. Res.* 24, 2630-2622 (1996)).

[000216] O DNA que codifica um imunógeno, ou um vetor contendo o mesmo, pode ser empacotado em lipossomas. Lipídios adequados e análogos relacionados são descritos por US 5.208.036, 5.264.618, 5.279.833 e 5.283.185. Os vetores e o DNA que codificam um imunógeno também podem ser adsorvidos a ou associados com veículos particulados, exemplos dos quais incluem polímeros de metacrilato de polimetila e polilactídeos e poli(lactídeo-co-glicolídeos), ver, por exemplo, McGee et al., *J. Encap Micro.* (1996).

[000217] Vetores de terapia gênica ou DNA nu podem ser entregues *in vivo* pela administração a um paciente individual, tipicamente pela administração sistêmica (por exemplo, intravenosa, intraperitoneal, nasal, gástrica, intradérmica, intramuscular, subdérmica ou infusão intracraniana) ou aplicação tópica (ver, por exemplo, US 5.399.346). Tais vetores podem incluir ainda agentes facilitadores, tais como bupivacina (US 5.593.970). DNA também pode ser administrado usando uma arma gênica. (Ver Xiao & Brandsma, *supra.*) O DNA que codifica um imunógeno é precipitado na superfície de contas metálicas microscópicas. Os microprojéteis são acelerados com uma onda de choque ou gás hélio expandido, e penetram tecidos em uma profundidade de várias camadas celulares. Por exemplo, o Dispositivo de Entrega Gênica Accel® produzido por Agacetis, Inc. Middleton WI é adequado. Alternativamente, DNA nu pode passar através da pele na corrente sanguínea simplesmente pela colocação do DNA sobre a pele com irritação química ou mecânica (ver WO 95/05853).

[000218] Em uma variação adicional, vetores que codificam imunógenos podem ser entregues a células *ex vivo*, tal como células

explantadas de um paciente individual (por exemplo, linfócitos, aspirados de medula óssea, biópsia tecidual) ou células de tronco hematopoiéticas doadoras universais, seguida pela reimplantação das células em um paciente, normalmente após seleção das células que incorporaram o vetor.

IX. Adjuvantes

[000219] Agentes imunogênicos da invenção, tal como peptídeos, são às vezes administrados na combinação com um adjuvante. O adjuvante aumenta o título de anticorpos induzidos e/ou a afinidade de ligação de anticorpos induzidos em relação à situação se o peptídeo foi usado sozinho. Uma variedade de adjuvantes pode ser usada em combinação com um fragmento imunogênico de AA, para provocar uma resposta imune. Adjuvantes preferenciais aumentam a resposta intrínseca a um imunógeno sem causar modificações conformacionais no imunógeno que afetem a forma qualitativa da resposta. Adjuvantes preferenciais incluem hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio, 3 monofosforil lipídio De-O-acilado (MPL[®]) (ver GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, agora parte de Corixa), RC-529 (Corixa, Hamilton, Montana). STIMULON[®] QS-21 é um triterpeno glicosídico ou saponina isolado da casca da árvore Quillaja Saponaria Molina encontrada na América do Sul (ver Kensil *et al. em Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); Patente Americana N^o 5.057.540), (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA). Outros adjuvantes são emulsões óleo em água (tais como esqualeno ou óleo de amendoim), opcionalmente em combinação com estimulantes imunes, tais como monofosforil lipídio A (ver Stoute *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1997)), polímeros pluronic, e micobactérias mortas. Outro adjuvante é CpG (WO 98/40100). Os adjuvantes podem ser administrados como um componente de uma composição terapêutica

com um agente ativo ou podem ser administrados separadamente, antes, concorrentemente ou após administração do agente terapêutico.

[000220] Uma classe preferencial de adjuvantes são sais de alumínio (alúmen), tais como hidróxido de alúmen, fosfato de alúmen, sulfato de alúmen. Tais adjuvantes podem ser usados com ou sem outros agentes imunoestimuladores específicos, tais como MPL ou 3-DMP, QS-21, aminoácidos poliméricos ou monoméricos, tais como ácido poliglutâmico ou polilisina. Outra classe de adjuvantes são formulações de emulsão óleo-em-água. Tais adjuvantes podem ser usados com ou sem outros agentes imunoestimuladores específicos, tais como peptídeos de muramila (por exemplo, N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforilóxi)-etilamina (MTP-PE), N-acetilglicosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitóxi propilamida (DTP-DPP) THERAMIDE®), ou outros componentes da parede celular bacteriana. Emulsões óleo-em-água incluem (a) MF59 (WO 90/14837), contendo Esqualeno 5%, Tween 80 0,5%, e Span 85 0,5% (opcionalmente contendo várias quantidades de MTP-PE) formuladas em partículas submícron usando um microfluidizador, tal como o microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton MA), (b) SAF, contendo Esqualeno 10%, Tween 80 0,4%, polímero pluronic-bloqueado L121 5%, e thr-MDP, microfluidizados em uma emulsão submícron ou vortexados para gerar uma emulsão de tamanho de partícula maior, e (c) sistema adjuvante RIBI® (RAS), (Ribi ImmunoChem, Hamilton, MT) contendo esqualeno 2%, Tween 80 0,2%, e um ou mais componentes de parede celular bacteriana do grupo consistindo em monofosforil-lipídeo (MPL), trehalose dimicolato (TDM), e esqueleto de parede celular (CWS),

preferencialmente MPL + CWS (DETOX®).

[000221] Outra classe de adjuvantes preferenciais são adjuvantes saponina, tais como STIMULON® (QS-21, Aquila, Framingham, MA) ou partículas geradas a partir deste, tais como ISCOMs (complexos imunoestimuladores) e ISCOMATRIX. Outros adjuvantes incluem RC-529, GM-CSF e Adjuvante de Completo de Freund (CFA) e Adjuvante Incompleto de Freund (IFA). Outros adjuvantes incluem citocinas, tais como interleucinas (por exemplo, IL-1 α e peptídeos β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL13 e IL-15), fator estimulante de colônia de macrófago (M-CSF), fator estimulante de colônia de macrófago e granulócito (GM-CSF), fator de necrose tumoral (TNF), quimiocinas, tais como MIP1 α e β e RANTES. Outra classe de adjuvantes são os análogos de glicolípídeo incluindo N-glicosilamidas, N-glicosiluréias e N-glicosilcarbamatos, cada um dos qual é substituído no resíduo de açúcar por um aminoácido, como imunomoduladores ou adjuvantes (ver Patente Americana Nº 4.855.283). Proteínas de choque térmico, por exemplo, HSP70 e HSP90, também podem ser usadas como adjuvantes.

[000222] Um adjuvante pode ser administrado com um imunógeno como uma composição única, ou pode ser administrado antes, concorrente ou após administração do imunógeno. O imunógeno e o adjuvante podem ser empacotados e fornecidos no mesmo frasco ou podem ser empacotados em frascos separados e misturados antes do uso. O imunógeno e o adjuvante são tipicamente empacotados com uma etiqueta que indica a aplicação terapêutica desejada. Se o imunógeno e o adjuvante forem empacotados separadamente, a embalagem tipicamente inclui instruções para mistura antes do uso. A escolha de um adjuvante e/ou veículo depende da estabilidade da formulação imunogênica contendo o adjuvante, a via de administração, o esquema de dosagem, a eficácia do adjuvante na espécie que é

vacinada, e, em humanos, um adjuvante farmacologicamente aceitável é aquele que tenha sido aprovado ou é aprovável para administração humana por corpos reguladores pertinentes. Por exemplo, o Adjuvante completo de Freund não é adequado para administração humana. Alúmen, MPL e QS-21 são preferenciais. Opcionalmente, dois ou mais adjuvantes diferentes podem ser usados simultaneamente. Combinações preferenciais incluem alúmen com MPL, alúmen com QS-21, MPL com QS-21, MPL ou RC-529 com GM-CSF, e alúmen, QS-21 e MPL em conjunto. Além disso, o Adjuvante incompleto de Freund pode ser usado (Chang *et al.*, *Advanced Drug Delivery Reviews* 32, 173-186 (1998)), opcionalmente em combinação com algum de alúmen, QS-21 e MPL e todas as combinações dos mesmo.

X. Administração Passiva de Anticorpos

[000223] Agentes terapêuticos da presente invenção incluem anticorpos que se ligam especificamente a um epitopo compreendendo X_1EDX_2 em um agregado de proteína amiloide, em que X_1 é H, T, F, S, P, A ou qualquer outro resíduo de aminoácido que imediatamente precede ED em tal agregado de proteína amiloide; e em que X_2 é T, S, E, R, I, V, F, A ou qualquer outro resíduo de aminoácido imediatamente após ED em tal agregado de proteína amiloide, incluindo epitopos dentro de peptídeos amiloides, tais como AA. Os anticorpos usados para administração passiva podem ser anticorpos que se ligam a epitopos do N-terminal ou C-terminal de AA. Outras proteínas amiloides além da proteína amiloide A Sérica incluem proteína amiloide A sérica, proteína da cadeia leve da imunoglobulina, tal como, por exemplo, $V\lambda 6$ Wil ou $V\kappa$, polipeptídeo precursor amiloide de ilhota humana (IAPP), peptídeo amiloide beta, transtiretina (TTR) e ApoA1, bem como outros listados na Tabela 1 acima.

[000224] AA é formada pela clivagem proteolítica de SAA. Anticorpos preferenciais se ligam especificamente à neoepitopos de AA que se

formam na clivagem proteolítica de SAA. Anticorpos preferenciais ligam-se especialmente a um neoepitopo do C-terminal de AA, especialmente, tais anticorpos se ligam especificamente nos resíduos 70 a 76 da isoforma alfa de HAA1 (GHGAEDS, SEQ ID N°:4), nos resíduos 70 a 76 da isoforma beta de HAA1 (GHDAEDS, SEQ ID N°:5), nos resíduos 70 a 76 da isoforma gama de HAA1 (GHDAEDS, SEQ ID N°: 5), nos resíduos 70 a 76 das isoformas alfa e beta de HAA2 (GHGAEDS, SEQ ID N°: 10), nos resíduos 70 a 76 de HAA3 (GDHAEDS, SEQ ID N°:7), nos resíduos 78 a 84 de HAA4 (STVIEDS, SEQ ID N°:8), nos resíduos 69 a 75 de AA1 de camundongo (MAA1) (GRGHEDT, SEQ ID N°:9), nos resíduos 69 a 75 de MAA2 (GRGHEDT, SEQ ID N°: 9), nos resíduos 62 a 68 de MAA3 (GHGAEDS, SEQ ID N°:10), e nos resíduos 76 a 82 de MAA4 (NHGLETL, SEQ ID N°:11). Alguns anticorpos somente se ligam a um epitopo em um destes peptídeos. Outros anticorpos se ligam a epitopos em mais de um destes peptídeos. Por exemplo, alguns anticorpos se ligam especificamente a um peptídeo GHGAEDS, (SEQ ID N°: 4) e peptídeo GHDAEDS, SEQ ID N°: 5). Alguns anticorpos se ligam a um peptídeo GHGAEDS, SEQ ID N°: 4) sem se ligar especificamente a um peptídeo GHDAEDS, SEQ ID N°: 5). A ligação a pelo menos um dos peptídeos AA humanos é preferível. A ligação a pelo menos um dos peptídeos AA humanos e um peptídeo de camundongo correspondente é útil em que o mesmo anticorpo pode ser testado em um modelo de camundongo e posteriormente usado em humanos. Alguns anticorpos preferenciais se ligam especificamente a epitopos nos resíduos da isoforma alfa de HAA1 71 a 76, 72 a 76, 73 a 76, 74 a 76, 70 a 75, 70 a 74, 70 a 73, 70 a 72, 71 a 75, 72 a 75, 73 a 75, 71 a 74, 71 a 73, 72 a 74, ou resíduos de MAA1 70 a 75, 71 a 75, 72 a 75, 73 a 75, 69 a 74, 69 a 73, 69 a 72, 69 a 71, 70 a 74, 71 a 74, 72 a 74, 70 a 73, 70 a 72. Tais anticorpos

tipicamente se ligam especificamente a depósitos amiloides, mas pode ou pode não ligar-se a AA solúvel. Quando um anticorpo é dito ligar-se especificamente a um epitopo nos resíduos especificados, tal como resíduos 70 a 76 da isoforma alfa de HAA1, por exemplo, o que está entendido é que o anticorpo especificamente se liga a um polipeptídeo contendo os resíduos especificados (isto é, resíduos 70 a 76 da isoforma alfa de HAA1 neste exemplo). Tal anticorpo não necessariamente contata com cada resíduo nos resíduos 70 a 76 da isoforma alfa de HAA1. Nem cada substituição de aminoácido ou deleção nos resíduos 70 a 76 da isoforma alfa de HAA1 necessariamente significativamente afeta a afinidade de ligação. Tais anticorpos para o neoepitopo ligam-se a AA, mas não a SAA. A especificidade do epitopo de um anticorpo pode ser determinada, por exemplo, como descrito por WO 00/72880.

[000225] Os anticorpos usados para a administração passiva podem ser anticorpos para epitopos do N-terminal de AA. Anticorpos preferenciais se ligam especificamente a um neoepitopo do N-terminal de AA, especialmente, tais anticorpos se ligam especificamente aos resíduos 1 a 15 de HAA1 (RSFFSFLGEAFDGAR, SEQ ID Nº 80), resíduos 1 a 15 de HAA2 (RSFFSFLGEAFDGAR, SEQ ID Nº 80), resíduos 1 a 15 de HAA3 (QGWLTLKAAGQGAK, SEQ ID Nº 81), resíduos 1 a 15 de HAA4 (ESWRSFFKEA, (SEQ ID Nº 82), resíduos 1 a 15 de MAA1 (GFFSFVHEAFQGAGD, SEQ ID Nº 83), resíduos 1 a 15 de MAA2 (GFFSFVHEAFQGAGD, SEQ ID Nº 83), resíduos 1 a 9 de MAA3 (EAGQGSRD, (SEQ ID Nº 84), e resíduos 1 a 14 de MAA4 (WYSFFREAVQGTWD, SEQ ID Nº 85). Alguns anticorpos somente se ligam a um epitopo dentro de um destes peptídeos. Outros anticorpos se ligam a epitopos dentro de mais de um destes peptídeos. Por exemplo, alguns anticorpos se ligam especificamente a um peptídeo RSFFSFLGEAFDGAR, SEQ ID Nº: 80) e peptídeo

QGWLTFLKAAGQGAK, SEQ ID Nº: 81). Alguns anticorpos se ligam a um peptídeo RSFFSFLGEAFDGAR, SEQ ID Nº: 80) sem se ligar especificamente a um peptídeo QGWLTFLKAAGQGAK, SEQ ID Nº: 81). A ligação de pelo menos um dos peptídeos AA humanos é preferível. A ligação a pelo menos um dos peptídeos AA humanos e um peptídeo de camundongo correspondente é útil em que o mesmo anticorpo pode ser testado em um modelo de camundongo e posteriormente usado em humanos.

[000226] Alguns anticorpos se ligam especificamente a um epitopo composto de tal X_1EDX_2 preferencialmente tais anticorpos se ligam especificamente a tal epitopo em um agregado de proteína amiloide. Alguns de tais anticorpos preferencialmente se ligam especificamente a um agregado de proteína amiloide em relação à forma monomérica de tal proteína amiloide. Em alguns anticorpos, X_1 é H, T, F, S, P, ou A e X_2 é T, S, E, D, R, I, V, F ou A. Em tais anticorpos, quando X_1 é H, X_2 é T ou A; quando X_1 é A, X_2 é S, T, E ou V; quando X_1 é T, X_2 é E; quando X_1 é F, X_2 é D; quando X_1 é S, X_2 é E, F ou A; e quando X_1 é P, X_2 é E, I ou F. Em alguns anticorpos, X_1 é H, T, F, S, P, ou A e X_2 é T, S, E, D, R, I, V, F ou A, com a ressalva que se X_1 for A, X_2 não seja V. Em alguns anticorpos, quando X_1 é A, X_2 é S, T ou E.

[000227] Alguns anticorpos se ligam especificamente a um epitopo compreendendo a sequência de aminoácidos GHEDT, (SEQ ID Nº 3), HEDT, (SEQ ID Nº: 12), AEDS, (SEQ ID Nº: 13), AEDT, (SEQ ID Nº: 14), HEDA, (SEQ ID Nº: 15), TEDE, (SEQ ID Nº: 16), FEDD, (SEQ ID Nº: 17), SEDE, (SEQ ID Nº: 18), AEDE, (SEQ ID Nº: 19), PEDE, (SEQ ID Nº: 20), PEDI, (SEQ ID Nº: 21), PEDF, (SEQ ID Nº: 22), AEDV, (SEQ ID Nº: 23), SEDF, (SEQ ID Nº: 24) ou SEDA, (SEQ ID Nº: 25).

[000228] Alguns anticorpos se ligam especificamente a um peptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em GHEDT, (SEQ ID Nº: 3), HEDT, (SEQ ID Nº:

12), AEDS, (SEQ ID Nº: 13), AEDT, (SEQ ID Nº: 14), HEDA, (SEQ ID Nº: 15), TEDE, (SEQ ID Nº: 16), FEDD, (SEQ ID Nº: 17), SEDE, (SEQ ID Nº: 18), AEDE, (SEQ ID Nº: 19), PEDE, (SEQ ID Nº: 20), PEDI, (SEQ ID Nº: 21), PEDF, (SEQ ID Nº: 22), SEDF, (SEQ ID Nº: 24) e SEDA, (SEQ ID Nº: 25). Alguns anticorpos se ligam especificamente a um peptídeo compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em GHEDT, (SEQ ID Nº: 3), HEDT, (SEQ ID Nº: 12), AEDS, (SEQ ID Nº: 13), AEDT, (SEQ ID Nº: 14), HEDA, (SEQ ID Nº: 15) e TEDE, (SEQ ID Nº: 16).

[000229] Alguns anticorpos são contruídos para peptídeo compreendendo GHEDT, (SEQ ID Nº: 3), tal como, por exemplo, 2A4, 7D8 e 8G9, ou são humanizados ou versões quiméricas dos mesmos.

[000230] Anticorpos podem ser policlonais ou monoclonais. Soros policlonais tipicamente contêm populações mistas de anticorpos que se ligam especificamente a vários epitopos ao longo de AA. Entretanto, os soros policlonais podem ser específicos para um segmento específico de AA, tal como resíduos 70 a 76 da isoforma alfa de HAA1. Anticorpos preferenciais são quiméricos, ou humanizados (ver Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989) e WO 90/07861, US 5.693.762, US 5.693.761, US 5.585.089, US 5.530.101 e Winter, US 5.225.539), ou humanos (Lonberg et al., WO93/12227 (1993); US 5.877.397, US 5.874.299, US 5.814.318, US 5.789.650, US 5.770.429, US 5.661.016, US 5.633.425, US 5.625.126, US 5.569.825, US 5.545.806, *Nature* 148, 1547-1553 (1994), *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996), Kucherlapati, WO 91/10741 (1991)). Uma abordagem alternativa para humanizar um anticorpo, também conhecida como "veneering", é descrita em US 6.797.492. Vários anticorpos de camundongo de especificidades de ligação diferentes estão disponíveis como materiais iniciais para produzir anticorpos humanizados.

[000231] Anticorpos humanizados representativos são a versão humanizada de anticorpo 7D8 (Número de acesso no ATCC _____), versão humanizada do anticorpo 7D29, versão humanizada do anticorpo 7D19, versão humanizada do anticorpo 7D47, versão humanizada do anticorpo 7D39, versão humanizada do anticorpo 7D66, versão humanizada do anticorpo 8G9, versão humanizada do anticorpo 8G3, versão humanizada do anticorpo 8G4, versão humanizada do anticorpo 8G51, versão humanizada do anticorpo 8G22, versão humanizada humanizou do anticorpo 8G30, versão humanizada do anticorpo 8G46, versão humanizada do anticorpo 2A4 (Número de acesso no ATCC _____), versão humanizada do anticorpo 2A20, versão humanizada do anticorpo 2A44, versão humanizada do anticorpo 2A77, versão humanizada do anticorpo 2A13, versão humanizada do anticorpo 2A14. Os hibridomas que produzem o anticorpo 7D8 (JH80 7D8.29.19.47) e o anticorpo 2A4 (JH80 2A4.20.44077) foram depositados no dia 4 de setembro de 2008, e no dia 17 de dezembro de 2008, respectivamente, no American Type Culture Collection (ATCC), atualmente localizado em 10801 University Boulevard, Manassas, VA20110-2209, sob as provisões do Tratado de Budapeste para o Reconhecimento Internacional do Depósito de Micro-organismos para os Fins de Procedimento de Patente ("Tratado de Budapeste"). O ATCC designou o hibridoma produtor de 7D8 Nº de Acesso no ATCC _____, e o hibridoma produtor de 2A4 Nº de Acesso no ATCC _____.

[000232] O isotipo humano IgG1 é preferencial para anticorpos para a região C terminal de AA por ter a mais alta afinidade dos isotipos humanos para o receptor FcRI em células fagocíticas. Alguns anticorpos se ligam especificamente a AA com uma afinidade de ligação maior ou igual a aproximadamente 10^7 , 10^8 , 10^9 ou 10^{10} M^{-1} .

[000233] A imunização ativa com fragmentos de AA pode ser

combinada com a administração passiva de anticorpos. Exemplos de combinações específicas incluem fragmentos AA compreendendo resíduos 70 a 76 da isoforma alfa de HAA1 com anticorpos que se ligam especificamente ao epitopo nos resíduos 70 a 76 da isoforma alfa de HAA1; fragmentos de AA compreendendo 70 a 76 resíduos da isoforma alfa de HAA1 com anticorpos que se ligam especificamente ao epitopo nos resíduos 71 a 76 da isoforma alfa de HAA1; fragmentos de AA compreendendo 70 a 76 resíduos da isoforma alfa de HAA1 com anticorpos que se ligam especificamente ao epitopo nos resíduos 72 a 76 da isoforma alfa de HAA1; fragmentos de AA compreendendo os resíduos 70 a 76 da isoforma alfa de HAA1 com anticorpos que se ligam especificamente ao epitopo nos resíduos 73 a 76 da isoforma alfa de HAA1; fragmentos de AA compreendendo os resíduos 70 a 76 da isoforma alfa de HAA1 com anticorpos que se ligam especificamente ao epitopo nos resíduos 74 a 76 da isoforma alfa de HAA1; fragmentos de AA compreendendo os resíduos 70 a 76 da isoforma alfa de HAA1 com anticorpos que se ligam especificamente ao epitopo nos resíduos 70 a 75 da isoforma alfa de HAA1; fragmentos de AA compreendendo os resíduos 70 a 76 da isoforma alfa de HAA1 com anticorpos que se ligam especificamente ao epitopo nos resíduos 70 a 74 da isoforma alfa de HAA1; fragmentos de AA compreendendo os resíduos 70 a 76 da isoforma alfa de HAA1 com anticorpos que se ligam especificamente ao epitopo nos resíduos 70 a 73 da isoforma alfa de HAA1; fragmentos de AA compreendendo os resíduos 70 a 76 da isoforma alfa de HAA1 com anticorpos que se ligam especificamente ao epitopo nos resíduos 70 a 72 da isoforma alfa de HAA1; fragmentos de AA compreendendo os resíduos 70 a 76 da isoforma alfa de HAA1 com anticorpos que se ligam especificamente ao epitopo nos resíduos 71 a 75 da isoforma alfa de HAA1; fragmentos de AA compreendendo os resíduos 70 a 76 da isoforma alfa de HAA1

com anticorpos que se ligam especificamente ao epitopo nos resíduos 72 a 75 da isoforma alfa de HAA1; fragmentos de AA compreendendo os resíduos 70 a 76 da isoforma alfa de HAA1 com anticorpos que se ligam especificamente ao epitopo nos resíduos 73 a 75 da isoforma alfa de HAA1; fragmentos de AA compreendendo os resíduos 70 a 76 da isoforma alfa de HAA1 com anticorpos que se ligam especificamente ao epitopo nos resíduos 73 a 75 da isoforma alfa de HAA1; fragmentos de AA compreendendo os resíduos 70 a 76 da isoforma alfa de HAA1 com anticorpos que se ligam especificamente ao epitopo nos resíduos 71 a 74 da isoforma alfa de HAA1; fragmentos de AA compreendendo os resíduos 70 a 76 da isoforma alfa de HAA1 com anticorpos que se ligam especificamente ao epitopo nos resíduos 71 a 73 da isoforma alfa de HAA1; fragmentos de AA compreendendo os resíduos 70 a 76 da isoforma alfa de HAA1 com anticorpos que se ligam especificamente ao epitopo nos resíduos 72 a 74 da isoforma alfa de HAA1. Adicionalmente, fragmentos de AA compreendendo os resíduos 71 a 76, 72 a 76, 73 a 76, 74 a 76, 70 a 75, 70 a 74, 70 a 73, 70 a 72, 71 a 75, 72 a 75, 73 a 75, 71 a 74, 71 a 73, 72 a 74 da isoforma alfa de HAA1 podem ser combinados com anticorpos que se ligam especificamente a um epitopo nos resíduos 71 a 76, 72 a 76, 73 a 76, 74 a 76, 70 a 75, 70 a 74, 70 a 73, 70 a 72, 71 a 75, 72 a 75, 73 a 75, 71 a 74, 71 a 73, 72 a 74 da isoforma alfa de HAA1. Fragmentos de AA compreendendo os resíduos 70 a 76 da isoforma alfa de HAA1, os resíduos 70 a 76 da isoforma beta de HAA1, os resíduos 70 a 76 da isoforma gama de HAA1, os resíduos 70 a 76 das isoformas alfa e beta de HAA2, os resíduos 69 a 75 de MAA1, os resíduos 69 a 75 de MAA2, ou os resíduos 62 a 68 de MAA3 podem ser combinados com anticorpos que se ligam especificamente a um epitopo nos resíduos 70 a 76 da isoforma alfa de HAA1, resíduos 70 a 76 da isoforma beta de HAA1, resíduos 70 a 76 da isoforma gama de HAA1, resíduos 70 a 76

das isoformas alfa e beta de HAA2, resíduos 69 a 75 de MAA1, resíduos 69 a 75 de MAA2, ou resíduos 62 a 68 de MAA3.

[000234] Alguns anticorpos descritos acima não se ligam especificamente à forma monomérica ou à forma precursora da proteína amiloide. Alguns de tais anticorpos se ligam especificamente a um neoepitopo gerado na clivagem da proteína precursora resultando em uma proteína amiloide. Por exemplo, alguns anticorpos se ligam especificamente aos resíduos do C-terminal fibrilas AA de camundongo-HEDT, (SEQ ID Nº: 12), mas não se ligam especificamente a um peptídeo que se estende na porção não amiloide de SAA (GHEDTMADQE, SEQ ID Nº: 61). Alguns anticorpos se ligam especificamente a um epitopo conformacional. Alguns de tais epitopos conformacionais são lineares. Alguns de tais epitopos conformacionais são expostos quando uma proteína amiloide entra em uma estrutura agregada (por exemplo, fibrilar) ou torna-se parcialmente desnaturada. Exemplos de tais anticorpos incluem anticorpos monoclonais murinos 2A4 (Número de acesso no ATCC _____), 8G9 (Número de acesso no ATCC _____) e 7D8 (Número de acesso no ATCC _____), formas humanas, humanizadas e quiméricas dos mesmos, outros anticorpos que se ligam especificamente ao mesmo epitopo que 2A4, 8G9 ou 7D8, e fragmentos de ligação a antígeno de tais anticorpos. Alguns anticorpos se ligam especificamente a uma proteína amiloide compreendendo a sequência de aminoácidos ED. Alguns anticorpos se ligam especificamente a uma proteína amiloide selecionada a partir do grupo consistindo da proteína da cadeia leve da imunoglobulina, polipeptídeo precursor amiloide de ilhota humana (IAPP), peptídeo amiloide beta, transtiretina (TTR) e ApoA1.

[000235] Sabe-se que a unidade estrutural básica do anticorpo compreende um tetrâmero de subunidades. Cada tetrâmero é

composto de dois pares idênticos de cadeias polipeptídicas, cada par tendo uma cadeia "leve" (aproximadamente 25 kDa) e uma "pesada" (aproximadamente 50 a 70 kDa). A porção amino-terminal de cada cadeia inclui uma região variável de aproximadamente 100 a 110 ou mais aminoácidos responsáveis principalmente pelo reconhecimento do antígeno. A porção carbóxi terminal de cada cadeia define uma região constante responsável principalmente pela função efetora.

1. Anticorpos

[000236] A invenção inclui anticorpos intactos e fragmentos de anticorpo de ligação a antígeno, bem como anticorpos pegilados e fragmentos de anticorpo, bem como anticorpos com função efetora alterada (por exemplo, reduzida ou eliminada), por exemplo, anticorpos compreendendo mutações ou resíduos substituídos na região Fc. Exemplos de porções imunologicamente ativas de moléculas de imunoglobulina incluem fragmentos F(ab) e F(ab')₂ tri-Fab', Fab', Fv, scFv, di-Fab' que podem ser gerados pelo tratamento do anticorpo com uma enzima, tal como pepsina ou produzidos por técnicas de engenharia recombinantes reconhecidas na técnica. Fragmentos de anticorpos de ligação a antígeno adicionais da invenção incluem fragmentos de anticorpo terapêuticos, incluindo fragmentos de anticorpo pegilados, tais como Fab' PEGilado e di-Fab' PEGilado. Exemplos de mutantes de função efetora são descritos na Patente Americana Nº 5.624.821, que é incorporada por referência neste pedido em sua totalidade. Alguns anticorpos têm reduzida afinidade de ligação pelo receptor RI gama Fc. Anticorpos de função efetora mutante incluem anticorpos compreendendo mutações na região de dobradiça. Alguns anticorpos IgG mutantes compreendem uma mutação na região constante da cadeia pesada em uma ou mais das posições 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 e 322. Em alguns anticorpos um ou mais dos resíduos 234, 236 e 237 são substituídos

por alanina. Em alguns anticorpos, o resíduo 235 é substituído por glutamina. Em alguns anticorpos, o resíduo 297 é substituído por alanina. Em alguns anticorpos, os resíduos 318, 320 e 322 são substituídos por alanina. Em alguns anticorpos, o resíduo 318 é substituído por valina. Em alguns anticorpos, o resíduo 322 é substituído por glutamina. Anticorpos com a função efetora aumentada incluem anticorpos únicos S239D e I332E e os duplo e triplo mutantes S239D/I332E e S239D/I332E/A330L (numeração Kabat).

2. Anticorpos Policlonais

[000237] Anticorpos policlonais podem ser preparados como descrito acima pela imunização de um indivíduo adequado com um imunógeno. O título de anticorpo no indivíduo imunizado pode ser monitorado em algum tempo por técnicas padrão, tais como com um ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) usando o antígeno alvo imobilizado. Se desejado, as moléculas de anticorpo direcionadas contra o antígeno-alvo podem ser isoladas do mamífero (por exemplo, do sangue) e ainda purificadas por técnicas bem conhecidas, tais como cromatografia em Sepharose proteína A um para obtenção da fração anticorpo, por exemplo, IgG,. Em um tempo apropriado após imunização, *por exemplo*, quando os títulos de anticorpo antiantígeno são os mais altos, células produtoras do anticorpo podem ser obtidas do indivíduo e usadas para preparar anticorpos monoclonais por técnicas-padrão, tal como a técnica de hibridoma originalmente descrita por Kohler e Milstein (1975) *Nature* 256:495-497) (ver também, Brown *et al.* (1981) *J. Immunol.* 127:539-46; Brown *et al.* (1980) *J. Biol. Chem.* 255:4980-83; Yeh *et al.* (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:2927-31; e Yeh *et al.* (1982) *Int. J. Cancer* 29:269 a 75). Para a preparação de anticorpos policlonais quiméricos, ver Buechler *et al.* Patente Americana Nº 6.420.113.

3. Anticorpos Monoclonais

[000238] Qualquer dos muitos protocolos bem conhecidos usados para fundir linfócitos e linhagens celulares imortalizadas pode ser aplicado com o objetivo de gerar um anticorpo monoclonal (ver, por exemplo, G. Galfre *et al.* (1977) *Nature* 266:55052; Gefter *et al.* *Somatic Cell Genet.*, citado *supra*; Lerner, *Yale J. Biol. Med.*, citado *supra*; Kenneth, *Monoclonal Antibodies*, citado *supra*). Além disso, a pessoa versada apreciará que há muitas variações de tais métodos que também seriam úteis. Tipicamente, a linhagem celular imortal (por exemplo, uma linhagem celular de mieloma) é derivada da mesma espécie mamífera que os linfócitos. Por exemplo, hibridomas murinos podem ser feitos pela fusão de linfócitos de um camundongo imunizado com uma preparação imunogênica da presente invenção com uma linhagem celular de camundongo imortalizada. Linhagens celulares imortais preferenciais são linhagens celulares de mieloma de camundongo que são sensíveis ao meio de cultura contendo hipoxantina, aminoptericina e timidina ("meio HAT"). Alguma de diversas linhagens celulares de mieloma pode ser usada como um parceiro de fusão de acordo com técnicas-padrão, por exemplo, as linhagens de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 ou Sp2/O-Ag14. Estas linhagens de mieloma estão disponíveis no ATCC. Tipicamente, células de mieloma de camundongo sensíveis a HAT são fundidas aos esplenócitos de camundongo usando polietilenoglicol ("PEG"). As células de hibridoma que resultam da fusão então são selecionadas usando meio de HAT, que mata as células de mieloma não fundidas e improdutivamente fundidas (esplenócitos não fundidos morrem após vários dias porque não estão transformados). As células de hibridoma que produzem um anticorpo monoclonal da invenção são detectadas pelo rastreamento dos sobrenadantes da cultura de hibridoma por anticorpos que se ligam a um antígeno-alvo, por exemplo, um A β , usando um ensaio ELISA padrão.

4. Anticorpos Recombinantes

[000239] Em alternativa à preparação de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais, um anticorpo monoclonal pode ser identificado e isolado pelo rastreamento de uma biblioteca de imunoglobulina combinatória recombinante (por exemplo, uma biblioteca de exposição de fago de anticorpo) com um antígeno-alvo para isolar por meio disso, membros da biblioteca de imunoglobulina que se ligam ao antígeno-alvo. Conjuntos para geração e rastreamento de bibliotecas de exposição de fago estão comercialmente disponíveis (por exemplo, Pharmacia *Recombinant Phage Antibody System*, Nº de Catálogo 27-9400-01; e Stratagene *SurfZAP® Phage Display Kit*, Nº de Catálogo 240612). Adicionalmente, exemplos de métodos e reagentes particularmente acessíveis para uso na geração e rastreamento de biblioteca de exposição de anticorpo podem ser encontrados em, por exemplo, Ladner *et al.* Patente Americana Nº 5.223.409; Kang *et al.* Publicação Internacional PCT Nº WO 92/18619; Dower *et al.* Publicação Internacional PCT Nº WO 91/17271; Winter *et al.* Publicação Internacional PCT WO 92/20791; Markland *et al.* Publicação Internacional PCT Nº WO 92/15679; Breitling *et al.* Publicação Internacional PCT WO 93/01288; McCafferty *et al.* Publicação Internacional PCT Nº WO 92/01047; Garrard *et al.* Publicação Internacional PCT Nº WO 92/09690; Ladner *et al.* Publicação Internacional PCT Nº WO 90/02809; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clarkson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580; Garrad *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc.*

Acid Res. 19:4133-4137; Barbas *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982; e McCafferty *et al.* *Nature* (1990) 348:552-554.

5. Anticorpos Quiméricos e Humanizados

[000240] Adicionalmente, anticorpos recombinantes, tais como anticorpos monoclonais quiméricos e humanizados, compreendendo tanto porções humanas como não humanas, que podem ser feitas usando técnicas de DNA recombinante padrão, estão dentro do escopo da invenção.

[000241] O termo "imunoglobulina humanizada" ou "anticorpo humanizado" refere-se a uma imunoglobulina ou anticorpo que inclui pelo menos uma imunoglobulina ou cadeia de anticorpo humanizada (isto é, pelo menos uma cadeia leve ou pesada humanizada). O termo "cadeia de imunoglobulina humanizada" ou "cadeia do anticorpo humanizado" (isto é, "uma cadeia leve da imunoglobulina humanizada" ou "cadeia pesada da imunoglobulina humanizada") refere-se a uma imunoglobulina ou cadeia de anticorpo (isto é, uma cadeia leve ou pesada, respectivamente) tendo uma região variável que inclui uma região variável de região conservada substancialmente de uma imunoglobulina ou anticorpo humanos e regiões de determinação de complementaridade (CDRs) (por exemplo, pelo menos uma CDR, preferencialmente duas CDRs, mais preferencialmente três CDRs) substancialmente de uma imunoglobulina ou anticorpo não humanos, e além disso inclui regiões constantes (por exemplo, pelo menos uma região constante ou porção da mesma, no caso de uma cadeia leve, e três regiões constantes no caso de uma cadeia pesada). O termo "região variável humanizada" (por exemplo, a "região variável da cadeia leve humanizada" ou "região variável da cadeia pesada humanizada") refere-se a uma região variável que inclui uma região conservada variável substancialmente de uma imunoglobulina ou anticorpo humanos e regiões de determinação de complementaridade

(CDRs) substancialmente de uma imunoglobulina ou anticorpo não humanos.

[000242] A frase "substancialmente de uma imunoglobulina ou anticorpo humanos" ou "substancialmente humano" significa que, quando alinhada a uma sequência amino humana de imunoglobulina ou anticorpo para fins de comparação, a região compartilha identidade de pelo menos 80 a 90%, 90 a 95%, ou 95 a 99% (isto é, identidade de sequência local) com a região sequência da região conservada ou constante humana, permitindo, por exemplo, substituições conservativas, substituições de sequência consenso, substituições de linhagem germinativa, retromutações e similares. A introdução de substituições conservativas, substituições de sequência consenso, substituições de linhagem germinativa, retromutações, e similares, é muitas vezes referida como "otimização" de um anticorpo ou cadeia humanizada. A frase "substancialmente de uma imunoglobulina não humana ou anticorpo" ou "substancialmente não humano" significa ter uma sequência de imunoglobulina ou anticorpo pelo menos 80 a 95%, preferencialmente pelo menos 90 a 95%, mais preferencialmente, 96%, 97%, 98%, ou 99% idêntico àquela de um organismo não humano, por exemplo, um mamífero não humano.

[000243] Consequentemente, todas as regiões ou resíduos de uma imunoglobulina ou anticorpo humanizados, ou de uma imunoglobulina ou cadeia de anticorpo humanizado, exceto as CDRs, são substancialmente idênticos às regiões correspondentes ou aos resíduos de uma ou mais sequências de imunoglobulina humana nativas. O termo "região correspondente" ou "resíduo correspondente" refere-se a uma região ou resíduo em um segundo aminoácido ou sequência nucleotídica que ocupa a mesma (isto é, equivalente) posição que uma região ou resíduo em um primeiro aminoácido ou sequência nucleotídica, quando as primeiras e segundas sequências

são otimamente alinhadas para fins de comparação.

[000244] O termo "identidade significativa" significa que duas sequências polipeptídicas, quando otimamente alinhadas, tal como pelos programas GAP ou BESTFIT usando de pesos de lacuna pré-configurados, compartilhando identidade de sequência de pelo menos 50 a 60%, identidade de sequência preferencialmente de pelo menos 60 a 70%, identidade de sequência mais preferencialmente de pelo menos 70 a 80%, identidade de sequência mais preferencialmente de pelo menos 80 a 90%, identidade de sequência ainda mais preferencialmente de pelo menos 90 a 95%, e identidade de sequência ainda mais preferencialmente de pelo menos 95% ou mais (por exemplo, identidade de sequência de 99% ou mais). O termo "identidade substancial" significa que duas sequências polipeptídicas, quando otimamente alinhadas, tal como pelos programas GAP ou BESTFIT usando pesos de lacuna pré-configurados, compartilhando identidade de sequência de pelo menos 80 a 90%, identidade de sequência preferencialmente de pelo menos 90 a 95%, e identidade de sequência mais preferencialmente de pelo menos 95% ou mais (por exemplo, identidade de sequência de 99% ou mais). Para a comparação de sequência, tipicamente uma sequência atua como uma sequência de referência, com a qual as sequências de teste são comparadas. Usando um algoritmo de comparação de sequência, as sequências teste e de referência são introduzidas em um computador, as coordenadas de subsequência são indicadas, se necessário, e os parâmetros do programa do algoritmo de sequência são indicados. O algoritmo de comparação de sequência então calcula a identidade de sequência percentual da sequência(s) teste em relação à sequência de referência, com base nos parâmetros de programa indicados.

[000245] O alinhamento ótimo de sequências por comparação pode ser conduzido, por exemplo, pelo algoritmo de homologia local de

Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), pelo algoritmo de alinhamento por homologia de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), pela busca do método de similaridade de Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), por implementações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no Pacote de Programas Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), ou pela inspeção visual (*ver genericamente* Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology). Um exemplo do algoritmo que é adequado para determinar a identidade de sequência percentual e a similaridade de sequência é o algoritmo BLAST, que é descrito em Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403 (1990). O programa para realizar análises no BLAST é publicamente disponível pelo National Center for Biotechnology Information (publicamente acessível pelo servidor de Internet do National Institutes of Health NCBI). Tipicamente, parâmetros de programa de pré-configurados podem ser usados para realizar a comparação de sequência, embora parâmetros personalizados também possam ser usados. Para sequências de aminoácido, o programa BLASTP usa como pré-configurados um wordlength (W) de 3, uma expectativa (E) de 10, e a matriz de marcação BLOSUM62 (*ver* Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)).

[000246] Preferencialmente, as posições de resíduo que não são idênticas diferenciam-se por substituições de aminoácido conservativas. Para fins de classificar substituições de aminoácidos como conservativas ou não conservativas, os aminoácidos são agrupados como se segue: Grupo I (cadeias laterais hidrofóbicas): leu, met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadeias laterais hidrofílicas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadeias laterais acídicas): asp, glu; Grupo IV (cadeias laterais básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (resíduos

que influenciam na orientação da cadeia): gly, pro; e Grupo VI (cadeias laterais aromáticas): trp, tyr, phe. Substituições conservativas envolvem substituições entre aminoácidos da mesma classe. Substituições não conservativas constituem a troca de um membro de uma destas classes por um membro de outra.

[000247] Preferencialmente, imunoglobulinas ou anticorpos humanizados se ligam ao antígeno com uma afinidade que está dentro de um fator de três, quatro ou cinco daquela do anticorpo não humanizado correspondente. Por exemplo, se o anticorpo não humanizado tiver uma afinidade de ligação de 10^{-9} M, os anticorpos humanizados terão uma afinidade de ligação de pelo menos 3×10^{-8} M, 4×10^{-8} M, 5×10^{-8} M, ou 10^{-9} M. Descrevendo as propriedades de ligação de uma imunoglobulina ou cadeia de anticorpo, a cadeia pode ser descrita com base na sua capacidade de "dirigir a ligação ao antígeno (*por exemplo*, A β)". Uma cadeia é dita "dirigir a ligação ao antígeno" quando confere a uma imunoglobulina ou anticorpo intacto (ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo) uma propriedade de ligação ou afinidade de ligação específicas. Uma mutação é dita (*por exemplo*, uma retromutação) afetar substancialmente a capacidade de uma cadeia pesada ou leve de dirigir a ligação ao antígeno se ela afetar (*por exemplo*, reduz) a afinidade de ligação de uma imunoglobulina ou anticorpo intacta (ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo) compreendendo a dita cadeia em pelo menos uma ordem de magnitude em comparação com aquela do anticorpo (ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo) compreendendo de uma cadeia equivalente sem a dita mutação. Uma mutação "não afeta substancialmente (*por exemplo*, reduz) a capacidade de uma cadeia de dirigir a ligação ao antígeno" se ela afetar (*por exemplo*, reduzir) a afinidade de ligação de uma imunoglobulina ou anticorpo intacta (ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo) compreendendo a dita

cadeia em somente um fator de dois, três ou quatro daquela do anticorpo (ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo) compreendendo uma cadeia equivalente sem a dita mutação.

[000248] O termo "imunoglobulina quimérica" ou anticorpo refere-se a uma imunoglobulina ou anticorpo cujas regiões variáveis derivam de uma primeira espécie e cujas regiões constantes derivam de uma segunda espécie. As imunoglobulinas quiméricas ou os anticorpos podem ser construídos, por exemplo, por engenharia genética, a partir de segmentos gênicos de imunoglobulina pertencentes a espécies diferentes. Os termos "imunoglobulina humanizada" ou "anticorpo humanizado" não são destinados a englobar imunoglobulinas ou anticorpos quiméricos, como definidos *infra*. Embora imunoglobulinas ou anticorpos humanizados sejam quiméricos na sua construção (isto é, compreendem regiões da proteína de mais de uma espécie), eles incluem características adicionais (isto é, regiões variáveis compreendendo os resíduos da CDR doadora e resíduos da região conservada aceptora) não encontradas em imunoglobulinas ou anticorpos quiméricos, como definido neste pedido.

[000249] Tais anticorpos monoclonais quiméricos e humanizados podem ser produzidos por técnicas de DNA recombinante conhecidas na técnica, por exemplo, usando métodos descritos em Robinson *et al.* Pedido de Patente Internacional Nº PCT/US86/02269; Akira, *et al.* Pedido de Patente Europeia 184.187; Taniguchi, M., Pedido de Patente Europeia 171.496; Morrison *et al.* Pedido de Patente Europeia 173.494; Neuberger *et al.* Publicação Internacional PCT Nº WO 86/01533; Cabilly *et al.* Patente Americana No. 4.816.567; Cabilly *et al.* Pedido de Patente Europeia 125.023; Better *et al.* (1988) *Science* 240:1041-1043; Liu *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sol *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218; Nishimura *et al.* (1987) *Canc.*

Res. 47:999-1005; Wood *et al.* (1985) *Nature* 314:446-449; e Shaw *et al.* (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison, S. L. (1985) *Science* 229:1202-1207; Oi *et al.* (1986) *BioTechniques* 4:214; Winter Patente Americana 5.225.539; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:552-525; Verhoeyan *et al.* (1988) *Science* 239:1534; e Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060. Os agentes terapêuticos também incluem miméticos de anticorpos, tais como miméticos da região de determinação de complementaridade (CDR).

6. Anticorpos Humanos de Animais Transgênicos e Exposição de Fago [000250] Alternativamente, é agora possível produzir animais transgênicos (por exemplo, camundongos) que são capazes, sob imunização, de produzir um repertório completo de anticorpos humanos na ausência da produção de imunoglobulina endógena. Por exemplo, foi descrito que a deleção homozigota do gene da região de junção da cadeia pesada do anticorpo (J_H) em camundongos quiméricos e mutantes de linhagem germinativa resulta na inibição completa da produção endógena de anticorpo. A transferência do arranjo gênico de imunoglobulina de linhagem germinativa humana em tais camundongos mutantes de linhagem germinativa resulta na produção de anticorpos humanos sob o desafio por antígeno. Ver, *por exemplo*, Patentes Americanas N^{os} 6.150.584; 6.114.598 e 5.770.429.

[000251] Anticorpos totalmente humanos também podem ser derivados de bibliotecas de exposição de fago (Hoogenboom *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)). Anticorpos policlonais quiméricos também podem ser obtidos a partir de bibliotecas de exposição de fago (Buechler *et al.* Patente Americana N^o 6.420.113).

7. Anticorpos Biespecíficos, Polipeptídeos de Fusão a Anticorpo e Anticorpos de Cadeia Única

[000252] Anticorpos biespecíficos (BsAbs) são anticorpos que têm

especificidades de ligação por pelo menos dois epitopos diferentes. Tais anticorpos podem ser derivados de anticorpos de completos ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, anticorpos biespecíficos F(ab)'2). Métodos para produzir anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica. A produção tradicional anticorpos biespecíficos completos é baseada na coexpressão de dois pares de cadeias leves e cadeias pesadas de imunoglobulina, onde as duas cadeias têm especificidades diferentes (Millstein *et al.*, Nature, 305:537-539 (1983)). Por causa da variedade randômica das cadeias pesadas e leves de imunoglobulina, estes hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de diferentes moléculas de anticorpo (ver, WO 93/08829 e em Traunecker *et al.*, EMBO J., 10:3655-3659 (1991)).

[000253] Anticorpos biespecíficos também incluem anticorpos interligados ou "heteroconjugados". Por exemplo, um dos anticorpos no heteroconjugado pode ser ligado a avidina, o outro à biotina ou outra carga útil. Os anticorpos do heteroconjugado podem ser feitos usando qualquer método de interligação adequado. Agentes de interligação adequados são bem conhecidos na técnica, e são revelados na Patente Americana Nº 4.676.980, junto com diversas técnicas de interligação.

[000254] Ainda em outro aspecto, o anticorpo pode ser fusionado, química ou geneticamente, a uma carga útil, tal como uma porção reativa, detectável ou funcional, por exemplo, uma imunotoxina para produzir um polipeptídeo de fusão ao anticorpo. Tais cargas úteis incluem, por exemplo, imunotoxinas, quimioterápicos, e radioisótopos, todos os quais são bem conhecidos na técnica.

[000255] Anticorpos de cadeia única são também adequados para estabilização de acordo com a invenção. Os fragmentos compreendem um domínio variável da cadeia pesada (VH) unido a um domínio variável da cadeia leve (VL) com um ligador, que permite a cada

região variável interrelacionar-se uma com a outra e recriar a bolsa de ligação ao antígeno do anticorpo parental do qual as regiões VL e VH são derivadas. Ver Gruber *et al.*, J. Immunol., 152:5368 (1994).

[000256] É entendido que qualquer molécula polipeptídica precedente, sozinha ou em combinação, é adequada para a preparação como formulações estabilizadas de acordo com a invenção.

XI. Indivíduos Sucetíveis ao Tratamento

[000257] Indivíduos ou pacientes suscetíveis ao tratamento incluem indivíduos em risco de doença, mas não exibindo sintomas, bem como pacientes há pouco exibindo sintomas. Por isso, os presentes métodos podem ser administrados profilaticamente à população geral sem a necessidade de qualquer estimativa do risco do paciente sujeito. Os presentes métodos são especialmente úteis para indivíduos que realmente têm um risco genético conhecido de desordens autoimunes. Tais indivíduos incluem aqueles tendo parentes que experimentaram esta doença e aqueles cujo risco é determinado pela análise de marcadores genéticos ou bioquímicos.

[000258] Pacientes que sofrem de amiloidose AA podem ser assintomáticos por um período de tempo prolongado. Por isso, o diagnóstico clínico da amiloidose AA muitas vezes é retardado ou não obtido até que os depósitos amiloides sejam extensos. Para aqueles pacientes que são sintomáticos, estima-se que somente 53% dos casos são diagnosticados. Ver L.E.K. Consulting, Independent Market Research (2003).

[000259] A invenção fornece métodos úteis para tratar ou efetuar profilaxia de uma doença caracterizada pela deposição de uma proteína amiloide, tal como, por exemplo, as doenças descritas acima, incluindo as listadas na Tabela 1. Alguns métodos são úteis para tratar ou efetuar profilaxia de uma doença caracterizada pela deposição de

uma proteína amiloide compreendendo a sequência de aminoácidos ED. Em alguns métodos, se a proteína amiloide compreender a sequência de aminoácidos AEDV, então o anticorpo não é administrado para tratar ou efetuar profilaxia de mal de Alzheimer ou Déficit Cognitivo Brando. A proteína amiloide pode ser alguma das proteínas amiloides descritas acima, incluindo as listadas na Tabela 1, tal como, por exemplo, proteína amiloide A sérica, proteína da cadeia leve da imunoglobulina, tal como, por exemplo, Vλ6 Wil ou Vκ, polipeptídeo precursor amiloide da ilhota humana (IAPP), peptídeo amiloide beta, transtiretina (TTR) ou ApoA1.

[000260] Os presentes métodos são especialmente úteis para indivíduos que realmente têm um risco conhecido, são suspeitos de ter, ou foram diagnosticados com amiloidose AA ou amiloidose AL. Tais indivíduos incluem, mas não são limitados aos que têm doenças inflamatórias crônicas, doenças inflamatórias hereditárias e infecções microbianas crônicas, tais como artrite reumatoide, artrite crônica juvenil, espondilite anquilosante, psoríase, artropatia psoriática, síndrome de Reiter, doença de Still do Adulto, síndrome de Behcet, doença de Crohn, Febre Mediterrânea Familiar, lepra, tuberculose, bronquiectasia, úlceras de decúbito, polinefrite crônica, osteomielite, doença de Whipple, mieloma, macroglobulinemia, discrasia de imunócito, gamopatia monoclonal, discrasia oculta. Condições inflamatórias e infecciosas crônicas são pré-requisito para o desenvolvimento de amiloidose AA e amiloidose AL manifestada pela amiloidose nodular local pode ser associada com doenças inflamatórias crônicas. Indivíduos que realmente têm risco conhecido de amiloidose AA também incluem, mas não são limitados aos que têm neoplasias malignas como linfoma de Hodgkin, carcinoma renal, carcinomas de intestino, pulmão e trato urogenital, carcinoma de célula basal e leucemia de célula cabeluda. Adicionalmente, indivíduos que

realmente têm risco conhecido de amiloidose AA também incluem, mas não são limitados aos que têm desordens linfoproliferativas, tais como Doença de Castleman.

[000261] Tanto em pacientes assintomáticos como em sintomáticos, o tratamento pode começar em qualquer momento antes ou após diagnóstico de doenças amiloides AA ou AL subjacentes. O tratamento tipicamente implica múltiplas dosagens por um período de tempo. O tratamento pode ser monitorado pela análise de anticorpo, das respostas de célula T (um efeito colateral) ou de célula B ativadas pelo agente terapêutico (por exemplo, peptídeo AA), ou empregando Cintilografia de SAP radiomarcada ao longo do tempo. Se a resposta cair, uma dosagem de reforço auxiliar é indicada.

XII. Regimes de Tratamento

[000262] Em geral, regimes de tratamento envolvem a administração de um agente eficaz para induzir uma resposta imunogênica a uma proteína amiloide, e preferencialmente a uma forma agregada de tal proteína amiloide, tal como, por exemplo, AA ou AL. Preferencialmente um fragmento imunogênico de AA ou AL ou um fragmento de X₁EDX₂ são administrados a um paciente. Em aplicações profiláticas, as composições farmacêuticas ou medicamentos são administrados a um paciente suscetível, ou de outra maneira em risco de, amiloidose, tal como Amiloidose AA ou amiloidose AL, em uma quantidade suficiente para eliminar ou reduzir o risco, diminuir a severidade ou retardar o início da doença, incluindo sintomas fisiológicos, bioquímicos, histológicos e/ou comportamentais da doença, suas complicações e apresentação de fenótipos patológicos intermediários apresentados durante o desenvolvimento da doença. Em aplicações terapêuticas, um agente é administrado a um paciente suspeito, ou já sofrendo de tal doença em um regime compreendendo uma quantidade e frequência de administração do agente suficientes para curar, ou pelo

menos parcialmente deter, ou inibir a deterioração dos sintomas da doença (fisiológicos, bioquímicos, histológicos e/ou comportamentais), incluindo suas complicações e fenótipos patológicos intermediários no desenvolvimento da doença. Em alguns métodos, a administração do agente reduz ou elimina a sintomatologia precoce em pacientes que ainda não desenvolveram patologia característica de amiloidose AI ou AA. Uma quantidade adequada para realizar o tratamento terapêutico ou profilático é definida como uma dose terapeuticamente ou profilaticamente eficaz. Uma combinação de quantidade e frequência de dosagem adequadas para realizar o tratamento terapêutico ou profilático é definida como um regime terapeuticamente ou profilaticamente eficaz. Tanto em regimes profiláticos como terapêuticos, os agentes são normalmente administrados em várias dosagens até que uma resposta imune suficiente tenha sido alcançada. Uma dosagem e frequência de administrações adequadas para realizar o tratamento terapêutico ou profilático são definidas como um regime terapeuticamente ou profilaticamente eficaz. Tipicamente, a resposta imune do paciente é monitorada e dosagens repetidas são fornecidas se a resposta imune começar a declinar. A resposta imune pode ser monitorada pela detecção de anticorpos, por exemplo, para AA ou AL no sangue no paciente ou pela detecção de níveis de, por exemplo, AA ou AL.

[000263] Doses eficazes dos agentes e composições da presente invenção, para o tratamento das condições descritas acima variam dependendo de muitos fatores diferentes, incluindo meios de administração, sítio visado, estado fisiológico do paciente, se o paciente é humano ou um animal, outras medicações administradas, e se o tratamento é profilático ou terapêutico. Normalmente, o paciente é um mamífero humano, mas não humanos incluindo mamíferos transgênicos também podem ser tratados. Dosagens de tratamento

têm que ser tituladas para otimizar segurança e eficácia. A quantidade do imunógeno depende de se o adjuvante também é administrado, com dosagens superiores sendo necessárias na ausência do adjuvante. A quantidade de um imunógeno para administração às vezes varia de 1 a 500 µg por paciente e mais usualmente de 5 a 500 µg por injeção para administração humana. Ocasionalmente, uma dose superior de 1 a 2 mg por injeção é usada. Tipicamente pelo menos 10, 20, 50 ou 100 µg são usados para cada injeção humana. A massa do imunógeno também depende da proporção de massa do epítipo imunogênico no imunógeno para a massa do imunógeno em conjunto. Tipicamente, 10^{-3} a 10^{-5} micromols de epítipo imunogênico são usados por micrograma de imunógeno. A determinação do tempo das injeções pode variar significativamente de uma vez por dia, a uma vez por ano, a uma vez por década. Em qualquer dado dia que uma dosagem do imunógeno é dada, a dosagem é maior do que 1 µg/paciente e normalmente maior do que 10 µg/paciente se o adjuvante também for administrado, e maior do que 10 µg/paciente e normalmente maior do que 100 µg/paciente na ausência do adjuvante. Um regime típico consiste de uma imunização seguida por injeções de reforço em intervalos de tempo, tais como intervalos de 6 semanas. Outro regime consiste em uma imunização seguida por injeções de reforço 1, 2 e 12 meses depois. Outro regime implica uma injeção a cada dois meses de vida. Alternativamente, as injeções de reforço podem ser em uma base irregular como indicado pelo monitoramento da resposta imune.

[000264] Doses de ácidos nucleicos que codificam imunógenos variam de aproximadamente 10 ng a 1 g, 100 ng a 100 mg, 1 µg a 10 mg, ou 30 a 300 µg de DNA por paciente. Doses de vetores virais infecciosos variam de 10 a 100, ou mais, vírions por dose.

[000265] Para imunização passiva com um anticorpo (em terapias de

combinação), a dosagem varia de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, 0,5 a menos de 5 mg/kg, e mais usualmente 0,01 a 5 mg/kg, 0,5 a 3 mg/kg, de peso corporal do hospedeiro. Por exemplo, as dosagens podem ser 1 mg/kg de peso corporal ou 10 mg/kg de peso corporal ou na faixa de 1 a 10 mg/kg ou em outras palavras, 70 mg ou 700 mg ou na faixa de 70 a 700 mg, respectivamente, para um paciente de 70 kg. Como um exemplo adicional, dosagens podem ser de menos de 5 mg/kg de peso corporal ou 1,5 mg/kg de peso corporal ou dentro da faixa de 0,5 a 1,5 mg/kg, preferencialmente pelo menos 1,5 mg/kg. Um regime de tratamento exemplar implica na administração de uma vez a cada duas semanas ou uma vez por mês ou uma vez a cada 3 a 6 meses. Em alguns métodos, dois ou mais anticorpos monoclonais com especificidades de ligação diferentes são administrados simultaneamente, caso em que a dosagem de cada anticorpo administrado está incluída nas faixas indicadas. O anticorpo é normalmente administrado em ocasiões múltiplas. Os intervalos entre dosagens únicas podem ser semanais, mensais ou anuais. Os intervalos também podem ser irregulares, como indicado pela medida dos níveis sanguíneos do anticorpo para AA no paciente. Em alguns métodos, a dosagem é ajustada para alcançar uma concentração plasmática de anticorpo de 1 a 1000 µg/ml e em alguns métodos 25 a 300 µg/ml. Alternativamente, o anticorpo pode ser administrado como uma formulação de liberação sustentada, caso em que administração menos frequente é necessária. A dosagem e frequência variam dependendo da meia-vida do anticorpo no paciente. Em geral, os anticorpos humanos mostram meia-vida mais longa, seguida por anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos e anticorpos não humanos. A dosagem e frequência de administração podem variar dependendo de se o tratamento é profilático ou terapêutico. Em aplicações profiláticas, uma dosagem relativamente baixa é

administrada em intervalos relativamente não frequentes ao longo de um longo período de tempo. Alguns pacientes continuam recebendo o tratamento pelo resto de suas vidas. Em aplicações terapêuticas, uma dosagem relativamente alta em intervalos relativamente curtos é às vezes necessária até que a progressão da doença seja reduzida ou descontinuada, e preferencialmente até que o paciente mostre melhora parcial ou completa dos sintomas da doença. Após isso, a patente pode ser administrada em um regime profilático.

[000266] Agentes para induzir uma resposta imune podem ser administrados por meios parenterais, tópicos, intravenosos, orais, subcutâneos, intra-arteriais, intracranianos, intraperitoniais, intranasais ou intramusculares para tratamento profilático e/ou terapêutico. A via de administração mais típica para um agente imunogênico é a subcutânea, embora outras vias possam ser igualmente eficazes. A próxima via mais comum é a injeção intramuscular. Este tipo de injeção é mais tipicamente realizado nos músculos da perna ou braço. Em alguns métodos, os agentes são injetados diretamente em um tecido específico onde os depósitos acumularam-se, por exemplo, injeção intracraniana. Injeção intramuscular ou infusão intravenosa são preferenciais para administração de anticorpo (em terapias de combinação). Em alguns métodos, anticorpos terapêuticos específicos são injetados diretamente no crânio. Em alguns métodos, os anticorpos são administrados como uma composição ou dispositivo de liberação sustentada, tal como um dispositivo MEDIPAD®.

[000267] Agentes da invenção muitas vezes são administrados como composições farmacêuticas compreendendo um agente terapêutico ativo, isto é, e uma variedade de outros componentes farmaceuticamente aceitáveis. Ver *Remington's Pharmaceutical Science* (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1980). A forma preferencial depende do modo de administração e

aplicação terapêutica desejada. As composições também podem incluir, dependendo da formulação desejado, veículos ou diluentes, farmaceuticamente aceitáveis, não tóxicos, que são definidos como veículos comumente usados para formular composições farmacêuticas para administração animal ou humana. O diluente é selecionado para não afetar a atividade biológica da combinação. Exemplos de tais diluentes são água destilada, salina tamponada em fosfato fisiológica, soluções de Ringer, solução de dextrose, e solução de Hank. Além disso, a composição ou formulação farmacêutica também pode incluir outros veículos, adjuvantes, ou estabilizadores não tóxicos, não terapêuticos, não imunogênicos e similares.

[000268] Composições farmacêuticas também podem incluir grandes macromoléculas, lentamente metabolizadas, tais como proteínas, polissacarídeos, tais como quitosana, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos e copolímeros (tais como SEPHAROSE® látex funcionalizada, agarose, celulose e similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácido, e agregados lipídicos (tais como gotículas de óleo ou lipossomas). Adicionalmente, estes veículos podem funcionar como agentes imunoestimuladores (isto é, adjuvantes).

[000269] Para administração parenteral, os agentes da invenção podem ser administrados como dosagens injetáveis de uma solução ou suspensão da substância em um diluente fisiologicamente aceitável com um veículo farmacêutico que pode ser um líquido estéril, tal como óleos aquosos, salina, glicerol ou etanol. Adicionalmente, substâncias auxiliares, tais como agentes umidificantes ou emulsionantes, tensoativos, substâncias de tamponamento de pH e similares podem estar presentes em composições. Outros componentes de composições farmacêuticas são aqueles de origem de petróleo, animal, vegetal ou sintética, por exemplo, óleo de amendoim, óleo de

soja e óleo mineral. Em geral, glicóis, tais como propilenoglicol ou polietilenoglicol são veículos líquidos preferenciais, particularmente para soluções injetáveis. Os anticorpos podem ser administrados na forma de uma preparação de implante ou injeção de armazenamento que pode ser formulada de tal maneira a permitir uma liberação sustentada do ingrediente ativo. Uma composição exemplar compreende o anticorpo monoclonal em 5 mg/mL, formulado em tampão aquoso composto de L-histidina 50 mM, NaCl 150 mM, ajustado ao pH 6,0 com HCl. Composições de administração parenteral são tipicamente substancialmente estéreis, isotônicas e produzidas sob condições GMP do FDA ou corpo similar.

[000270] Tipicamente, as composições são preparadas como injetáveis, como soluções ou suspensões líquidas; formas sólidas adequadas para solução ou suspensão em veículos líquidos antes da injeção também podem ser preparadas. A preparação também pode ser emulsionada ou encapsulada em lipossomas ou micropartículas, tais como polilactídeo, poliglicolídeo ou copolímero de efeito adjuvante aumentado, como discutido acima (ver Langer, *Science* 249, 1527 (1990) e Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, 97-119 (1997). Os agentes desta invenção podem ser administrados na forma de uma preparação de implante ou injeção de armazenamento que pode ser formulada de tal maneira a permitir uma liberação sustentado ou pulsátil do ingrediente ativo.

[000271] Formulações adicionais adequadas para outros modos de administração incluem formulações orais, intranasais e pulmonares, supositórios e aplicações transdérmicas.

[000272] Para supositórios, ligadores e veículos incluem, por exemplo, polialquilenoglicóis ou triglicerídeos; tais supositórios podem ser formados de misturas contendo o ingrediente ativo na faixa de 0,5% a 10%, preferencialmente 1% a 2%. Formulações orais incluem

excipientes, tais como classes farmacêuticas de manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, celulose e carbonato de magnésio. Estas composições tomam a forma de soluções, suspensões, comprimidos, pílulas, cápsulas, formulações de liberação sustentada ou pós e contêm 10% a 95% do ingrediente ativo, preferencialmente 25% a 70%.

[000273] Aplicação tópica pode resultar em entrega transdérmica ou intradérmica. Administração tópica pode ser facilitada pela coadministração do agente com toxina colérica ou derivados detoxificados ou subunidades dos mesmos ou outras toxinas bacterianas similares (Ver Glenn *et al.*, *Nature* 391, 851 (1998)). A coadministração pode ser alcançada usando os componentes como uma mistura ou como moléculas ligadas obtidas por interligação química ou expressão como uma proteína de fusão.

[000274] Alternativamente, a entrega transdérmica pode ser alcançada usando uma via cutânea ou usando transferossomas (Paul *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 25, 3521-24 (1995); Cevc *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta* 1368, 201-15 (1998)).

XIII. Regimes de Tratamento de Terapia de Fármaco Combinatória

[000275] Terapia de combinação de acordo com a invenção pode ser realizada sozinha ou em conjunto com outra terapia para tratar ou efetuar profilaxia de amiloidose AA. Terapia de combinação de acordo com a invenção também pode ser realizada em conjunto com outra terapia que trata ou efetua a profilaxia de uma doença amiloide subjacente, tal como doenças inflamatórias, infecções microbianas crônicas, neoplasias malignas, doenças inflamatórias hereditárias e desordens linfoproliferativas. Há grandes quantidades de tratamentos disponíveis em uso comercial, em avaliação clínica e em desenvolvimento pré-clínico, que podem ser selecionados para uso com a invenção então revelada para efetuar profilaxia e tratamento da

amiloidose AA pela terapia de combinação de fármaco. Tais tratamentos podem ser um ou mais compostos selecionados a partir de, mas não limitados a várias categorias principais, a saber, (i) fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs; por exemplo, detoprofeno, diclofenaco, diflunisal, etodolac, fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, cetoprofeno, meclofenamato, ácido mefenâmico, meloxicam, nabumeona, naproxeno de sódio, oxaprozina, piroxicam, sulindac, tolmetina, celecoxibe, rofecoxibe, aspirina, salicilato de colina, salsalto, e salicilato de sódio e magnésio); (ii) esteroides (por exemplo, cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triancinolona); (iii) DMARDs isto é, fármacos modificadores antirreumáticos (por exemplo, ciclosporina, azatioprina, metotrexato, leflunomida, ciclofosfamida, hidroxicloroquina, sulfasalazina, D-penicilamina, minociclina e ouro); ou (iv) proteínas recombinantes (por exemplo, ENBREL® (etanercept, um receptor de TNF solúvel) e REMICADE® (infliximabe) um anticorpo anti-TNF monoclonal quimérico).

[000276] A duração da terapia de combinação depende do tipo de doença subjacente que é tratada, a idade e condição do paciente, o estágio e tipo da doença do paciente, e como o paciente responde ao tratamento. O médico pode observar estreitamente os efeitos da terapia e fazer qualquer ajuste que seja necessário. Adicionalmente, uma pessoa que tem um maior risco de desenvolver Amiloidose AA (por exemplo, uma pessoa que é geneticamente predisposta ou anteriormente tinha uma desordem inflamatória ou outras doenças subjacentes) ou amiloidose AL pode receber tratamento profilático para inibir ou retardar o desenvolvimento de agregados AL AA, tais como fibrilas.

[000277] A dosagem, a frequência e o modo de administração de cada componente da combinação podem ser controlados

independentemente. Por exemplo, um composto pode ser administrado oralmente três vezes por dia, enquanto o segundo composto pode ser administrado intramuscularmente uma vez por dia. Terapia de combinação pode ser dada em ciclos periódicos que incluem períodos de descanso. Compostos também podem ser formulados em conjunto tal que uma administração entregue ambos os compostos. A combinação da invenção também pode ser fornecida como componentes do pacote farmacêutico. Os fármacos podem ser formulados em conjunto ou separadamente e em quantidades de dosagem individuais. Cada composto é misturado com uma substância veículo adequada, e está presente geralmente em uma quantidade de 1 a 95% por peso do peso total da composição.

[000278] A composição pode ser fornecida em uma forma de dosagem que seja adequada para administração oral, parenteral (por exemplo, intravenosa, intramuscular, subcutânea), retal, transdérmica, nasal, vaginal, inalações ou ocular. Dessa forma, a composição pode estar na forma de, por exemplo, comprimidos, cápsulas, pílulas, pós, granulados, suspensões, emulsões, soluções, géis incluindo hidrogéis, pastas, pomadas, cremes, curativos, banhos líquidos, dispositivos de entrega, supositórios, clísteres, injetáveis, implantes, pulverizadores ou aerossóis. Composições farmacêuticas podem ser formuladas de acordo com a prática farmacêutica convencional (ver, por exemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (19th ed.) ed. A. R. Gennaro, 1995, Mack Publishing Company, Easton, Pa. e Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, N.Y.

XIV. Métodos de Monitoramento ou Diagnóstico de Amiloidose AA ou AL

[000279] Métodos de monitoramento ou diagnóstico de amiloidose AA ou AL incluem a medida das concentrações plasmáticas de SAA e

proteína C-reativa, execução de biópsia tecidual (renal, retal, gástrico, gengival, gordura, glândulas salivares, labiais) e histologia com marcação com Congo Red e/ou imunomarcação com anticorpos específicos dirigidos contra agregados de AA ou AL, tal como fibrilas. A invenção fornece métodos de detecção de uma resposta ao anticorpo contra o peptídeo AA em um paciente que sofre de ou suscetível à Amiloidose AA. Os métodos são particularmente úteis para monitorar um curso de tratamento que é administrado a um paciente. Os métodos podem ser usados para monitorar tanto o tratamento terapêutico em pacientes sintomáticos como o tratamento profilático em pacientes assintomáticos. Alguns métodos envolvem a determinação de um valor de base de uma resposta ao anticorpo em um paciente antes da administração de uma dosagem de um agente imunogênico, e compará-lo com um valor de resposta imune após o tratamento. Um aumento significativo (isto é, maior do que a margem típica de erro experimental em medidas repetidas da mesma amostra, expressa em um desvio-padrão das médias de tais medidas) no valor da resposta do anticorpo sinaliza um resultado de tratamento positivo (isto é, que a administração do agente alcançou ou aumentou uma resposta imune). Se o valor da resposta do anticorpo não se modificar significativamente, ou reduzir, um resultado de tratamento negativo é indicado. Em geral, é esperado que pacientes que sofrem um curso inicial de tratamento com um agente imunogênico mostrem um aumento na resposta ao anticorpo com dosagens sucessivas, que eventualmente alcança um platô. A administração do agente é geralmente continuada enquanto a resposta ao anticorpo está aumentando. A obtenção do platô é um indicador de que o tratamento administrado pode ser descontinuado ou reduzido em dosagem ou frequência.

[000280] Em outros métodos, um valor controle (isto é, uma média e

desvio-padrão) de uma resposta ao anticorpo é determinado para uma população controle. Tipicamente os indivíduos na população controle não receberam tratamento prévio. Os valores medidos da resposta ao anticorpo em um paciente após administração de um agente terapêutico então são comparados com o valor controle. Um aumento significativo em relação ao valor controle (por exemplo, maior do que o desvio-padrão da média) sinaliza um resultado de tratamento positivo. Uma falta de aumento significativo ou uma redução sinaliza um resultado de tratamento negativo. A administração do agente é geralmente continuada enquanto a resposta ao anticorpo está aumentando em relação ao valor controle. Como antes, a obtenção de um platô em relação aos valores controle é um indicador de que a administração do tratamento pode ser descontinuada ou reduzida em dosagem ou frequência.

[000281] Em outros métodos, um valor controle de resposta ao anticorpo (por exemplo, uma média e desvio-padrão) é determinado a partir de uma população controle de indivíduos que sofreram o tratamento com um agente terapêutico e cujas respostas ao anticorpo alcançaram um platô em resposta ao tratamento. Os valores medidos de resposta ao anticorpo em um paciente são comparados com o valor controle. Se o nível medido em um paciente não for significativamente diferente (por exemplo, mais de um desvio-padrão) do valor controle, o tratamento pode ser descontinuado. Se o nível em um paciente estiver significativamente abaixo do valor controle, a administração continuada do agente é garantida. Se o nível no paciente persistir abaixo do valor controle, então uma modificação no regime de tratamento, por exemplo, uso de um adjuvante diferente, fragmento ou desvio da administração passiva pode ser indicado.

[000282] Em outros métodos, um paciente que não está recebendo atualmente o tratamento, mas sofreu um curso prévio de tratamento é

monitorado para resposta ao anticorpo para determinar se um recomeço do tratamento é necessário. O valor medido da resposta ao anticorpo no paciente pode ser comparado com um valor de resposta ao anticorpo anteriormente alcançado no paciente após um curso prévio de tratamento. Uma redução significativa em relação à medida prévia (isto é, maior do que uma margem típica de erro em medidas repetidas da mesma amostra) é uma indicação que o tratamento pode ser retomado. Alternativamente, o valor medido em um paciente pode ser comparado com um valor controle (média mais desvio-padrão) determinado em uma população de pacientes após sofrer um curso do tratamento. Alternativamente, o valor medido em um paciente pode ser comparado com um valor controle em populações de pacientes profilaticamente tratados que permanecem sem os sintomas da doença, ou populações de pacientes terapeuticamente tratados que mostram melhora de características de doença. Em todos estes casos, uma redução significativa em relação ao nível controle (isto é, mais que um desvio-padrão) é um indicador de que o tratamento deve ser retomado em um paciente.

[000283] Alguns métodos empregam Cintilografia de componente P amiloide sérico marcado com iodo-123 ou marcado com iodo-125 (^{123}I -SAP ou ^{125}I -SAP). ^{123}I -SAP ou ^{125}I -SAP são injetados intravenosamente em pacientes e examinados com câmera gama. A cintilografia com SAP radiomarcada é um método útil para monitorar a progressão de amiloidose em pacientes e avaliar tratamentos. É específica para o amiloide e pode ser usada para monitorar quantitativamente a posição e a quantidade de depósitos amiloides em pacientes. ^{123}I -SAP e ^{125}I -SAP não se acumulam em indivíduos saudáveis ou em pacientes não amiloides. Cintilografia com SAP radiomarcada pode ser usada para monitorar a renovação dinâmica do amiloide, e pode avaliar a eficácia de tratamentos direcionados a

depósitos amiloides regredidos. Além disso, cintilografia com SAP radiomarcada é não invasiva e fornece rastreamento de corpo inteiro. Os métodos da invenção envolvem a determinação de um valor de base de uma resposta ao anticorpo em um paciente antes da administração de uma dosagem de um agente, e comparação disto com um valor de resposta imune após o tratamento em um paciente. Um aumento significativo (isto é, maior do que a margem típica de erro experimental em medidas repetidas da mesma amostra, expressa em um desvio-padrão das médias de tais medidas) no valor da resposta ao anticorpo transmite um resultado de tratamento positivo (isto é, aquela administração do agente alcançou ou aumentou uma resposta imune). Se o valor da resposta ao anticorpo não se modificar significativamente, ou reduzir, um resultado de tratamento negativo é indicado. Em geral, espera-se que pacientes que sofrem um curso inicial de tratamento com um agente imunogênico mostrem um aumento na resposta ao anticorpo com dosagens sucessivas, que conseqüentemente alcançam um platô. A administração do agente é geralmente continuada enquanto a resposta ao anticorpo está aumentando. A obtenção do platô é um indicador que o tratamento administrado pode ser descontinuado ou reduzido em dosagem ou frequência.

[000284] A amostra tecidual para análise é tipicamente sangue, plasma, soro, fluido de mucosa ou cerebroespinhal do paciente. A amostra é analisada para a indicação de uma resposta imune a qualquer forma de peptídeo AL ou AA. A resposta imune pode ser determinada pela presença de anticorpos que se ligam especificamente ao peptídeo AL ou AA. Anticorpos podem ser detectados em um ensaio de ligação a um ligante que se liga especificamente aos anticorpos. Tipicamente o ligante é imobilizado. A ligação pode ser detectada usando um anticorpo anti-idiotípico

marcado.

[000285] Em regimes de combinação que empregam tanto administração ativa como passiva, abordagens análogas podem ser usadas para monitorar níveis do anticorpo resultantes de administração passiva.

[000286] Métodos de diagnóstico de amiloidose também podem ser empregados, por exemplo, pela administração a um indivíduo de um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo, que esteja ligado a uma marcação detectável, em que o anticorpo ou fragmento do mesmo se liga especificamente a um epitopo incluindo X_1EDX_2 em um agregado de proteína amiloide, em que X_1 e X_2 são qualquer aminoácido, e detecção da presença ou ausência do anticorpo ligado ou fragmento do mesmo. A detecção do anticorpo ligado ou fragmento apoia um diagnóstico de amiloidose. Anticorpos e fragmentos úteis no diagnóstico de amiloidose incluem os anticorpos revelados da invenção.

[000287] Os anticorpos ou fragmentos diagnósticos da invenção podem ser administrados, por exemplo, por injeção intravenosa no corpo de um paciente, ou diretamente no cérebro por injeção intracraniana. A dosagem de anticorpo é prontamente determinada por um versado na técnica. Tipicamente, o anticorpo é marcado, embora em alguns métodos, o anticorpo não seja marcado e um agente de marcação secundário seja usado para ligação ao anticorpo. A escolha da marcação depende dos meios de detecção. Por exemplo, uma marcação fluorescente é adequada para detecção ótica. O uso de marcações paramagnéticas é adequado para a detecção tomográfica sem intervenção cirúrgica. Radiomarcações podem ser usadas incluindo ^{211}At , ^{212}Bi , ^{67}Cu , ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{32}P , ^{212}Pb , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ou ^{90}Y . Tais marcações podem ser detectadas usando PET ou SPECT ou outra técnica adequada.

[000288] Diagnóstico também pode ser realizado pela comparação de número, tamanho e/ou intensidade de locais marcados, a valores de base correspondentes. Os valores de referência podem representar os níveis médios em uma população de indivíduos não doentes. Os valores de base também podem representar níveis prévios determinados no mesmo paciente. Por exemplo, os valores de base podem ser determinados em um paciente, e os valores medidos após isso comparados com os valores de base. Um aumento nos valores em relação aos sinais de base apoia um diagnóstico de amiloidose AA.

[000289] Os métodos diagnósticos da invenção podem ser usados para diagnosticar doenças de amiloidose incluindo amiloidose AA, amiloidose AL, mal de Alzheimer, Déficit Cognitivo Brando, polineuropatia amiloide, febre Mediterrânea, síndrome de Muckle-Wells, amiloidose sistêmica reativa associada com doenças inflamatórias sistêmicas, mieloma ou macroglobulinemia associada à amiloidose, amiloidose associada com discrasia imunocítica, gamopatia monoclonal, discrasia oculta, ou amiloidose nodular local associada com doenças inflamatórias crônicas.

XV. Modelos Animais de Amiloidose AA

[000290] Amiloidose AA pode ser induzida experimentalmente em camundongos nos quais as concentrações de SAA são marcadamente aumentadas pela injeção de nitrato de prata, caseína ou lipopolissacarídeo. Estes agentes estimulam a produção de citocinas. Ver Skinner et al. *Lab Invest.* 36:420-427 (1997) e Kisilevsky et al. *Bailliere's Clin. Immunol. Immunopathol.* 8 (3) 613-626 (1994). Dentro de 2 ou 3 semanas após estímulo inflamatório, os animais desenvolvem depósitos de AA sistêmicos, como encontrado em pacientes com Amiloidose AA. Esta fase de latência é dramaticamente encurtada quando fornece-se a camundongos, concomitantemente, uma injeção intravenosa de proteína extraída de baço ou fígado

carregado com amiloide AA de camundongo. Ver Axelrad et al. *Lab Invest.* 47(2):139-46 (1982). A atividade de aceleração amiloidogênica de tais preparações foi denominada "fator de potencialização amiloide" (AEF). Lundmark et al. relatam que o princípio ativo de AEF é inequivocamente a própria fibra AA. Além disso, demonstraram que este material é extremamente potente, sendo ativo em doses menores que 1 ng, e que conservou sua atividade biológica ao longo de um tempo considerável. Notavelmente, AEF também foi eficaz quando administrado oralmente. Eles concluíram que AA e possivelmente outras formas de amiloidose são doenças transmissíveis, similares a desordens associadas a príon. Ver Lundmark et al. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 99: 6979-6984 (2002).

[000291] A amiloide AA também pode ser induzida em linhagens transgênicas de camundongos que carregam o gene de interleucina 6 humana sob controle do promotor de metalotioneína-I resultando em concentrações marcadamente aumentadas de SAA e desenvolvendo amiloide no baço, fígado e rins aos 3 meses de idade. No momento da morte, em aproximadamente 8 a 9 meses, os órgãos destes camundongos transgênicos têm extensos depósitos amiloides. Ver Solomon et al., *Am. J. Pathol.* 154 (4):1267-1272 (1999).

[000292] O modelo de camundongo transgênico de Doença Amiloide Rapidamente Induzida Transgênica (TRIAD) é uma melhoria do modelo de camundongo transgênico acima descrito. Camundongos TRIAD carregam o gene de interleucina 6 humana sob controle do promotor de histocompatibilidade H-2L^D. A administração de AEF a camundongos TRIAD de 8 semanas de idade resulta em depósitos amiloides AA esplênicos e hepáticos proeminentes em 3 a 4 semanas. Posteriormente, este processo progride para outros órgãos, levando a morte 4 a 6 semanas depois. O desenvolvimento da amiloidose sistêmica é acelerado em comparação com o modelo de camundongo

transgênico descrito acima. Ver University of Tennessee Research Corporation, WO 01/77167, Farmacopéia, WO 95/35503 e Scripps, WO 95/30642 Wall et al. *Amyloid* 12(3):149-156 (2005) (cada um dos quais é incorporado por referência para todos os fins).

[000293] O sagui comum (*Callithrix jacchus*) é um pequeno primata do Novo Mundo natural do Brasil que tem sido extensivamente usado em pesquisa biomédica. Ludlage et al. relatam que foi encontrado que o sagui comum tem depósitos amiloides em um ou mais órgãos, incluindo fígado, glândulas adrenais, rins e intestino. Os autores colocam que fatores hereditários poderiam ser responsáveis pelo desenvolvimento de amiloidose AA neste primata. Neste sentido, o sagui comum pode servir como um modelo experimental único para estudo da patogênese e terapia de AA e outras desordens amiloides sistêmicas. Ver Ludlage et al. *Vet Pathol* 42:117-124 (2005).

[000294] A espécie Shar Pei de cão, uma raça que tem uma sequência AA com o motivo-AEDS e é particularmente suscetível à amiloidose AA, fornece um modelo que ocorre naturalmente de AA sistêmica em que avalia novas aplicações diagnósticas e terapêuticas de anticorpos específicos para a amiloide AA e outros compostos.

EXEMPLOS

Exemplo I. Fragmentos de AA.

[000295] Peptídeos correspondentes aos aminoácidos 71 a 75 - GHEDT, como descrito por Yamamoto e Migita *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:2915-2919 foram sintetizados por AnaSpec, San Jose, CA, EUA. Anticorpos policlonais (Pab) para AA foram construídos e a fração de imunoglobulina isolada, como anteriormente descrito por Bard, F. et al., (2000) *Nat. Med.* 6, 916-919.

Exemplo II. Imunógeno para Preparação de Anticorpos Murinos.

[000296] O epitopo usado foi GHEDT, (SEQ ID N^o: 3) com um ligador CG no seu N terminal. O peptídeo EPRB-39 que contém o epitopo é

ligado a anticorpo anticamundongo de ovelhas. EPRB-39 é obtido de Anasec, San Jose, CA. Os anticorpos produzidos parecem ser específicos para o neoepitopo porque não se ligam especificamente a um peptídeo que atravessa a região GHEDTIADQE, (SEQ ID N^o: 89).

Exemplo III. Procedimentos de Imunização.

[000297] Camundongos A/J de seis semanas foram injetados intraperitonealmente com 50 ug de IgG anticamundongo de ovelha/EPRB-39 com o Adjuvante Completo de Freund (CFA) seguido pelo adjuvante Incompleto de Freund (IFA) uma vez a cada duas semanas em um total de três injeções. Três dias antes da fusão, a veia da cauda foi injetada com 50 ug de IgG EPRB-39 para SAM em 90 ul de PBS. O título foi estimado em 1/10000 de ELISA com alto fundo.

[000298] JH80 é a quantidade de fusão de EPRB-39. A seguinte é uma lista dos clones e clones de diluição limitante que são ativos:

7D8.29.19.47*, 39, 66 IgG2b k

8G9.3.4.51.22*, 30, 46 IgG2b k

2A4.20.44.77*, 13, 14 IgG2b k

[000299] 7D47, 8G9 e 2A77 indicam subclones preferenciais. Os anticorpos produzidos parecem ser específicos para o neoepitopo porque não reagem com um peptídeo que atravessa o sítio de clivagem C-terminal de SAA.

Exemplo IV. Anticorpo de ligação a AA Agregada e Solúvel.

[000300] Títulos séricos (determinados por diluição seriada) e ligação de anticorpo monoclonal a agregado de AA foram realizados por ELISA como anteriormente descrito por Schenk D. et al., (1999) *Nature* 400, 173-177. AA solúvel refere-se às fibrilas AA sonicadas em dimetil sulfóxido. Diluições seriadas do anticorpo foram incubadas com 50.000 cpm de ¹²⁵I-AA durante a noite à temperatura ambiente. 50 µl de uma pasta fluida contendo sefarose proteína A 75 mg/ml (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia)/200 µg de IgG de coelho

anticamundongo (H+L) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EUA) foram incubados com os anticorpos diluídos por 1 hora à temperatura ambiente, lavados duas vezes e contados com um contador gama Wallac (PerkinElmer Life Science, Grove, IL, EUA). Todas as etapas foram realizadas em tampão de radioimunoensaio composto de Tris 10 mM, NaCl 0,5 M, gelatina 1 mg/ml, e Nonidet P-40 0,5%, pH 8,0.

Exemplo V. Análise da Estrutura de V λ 6 Wil.

[000301] As sequências dos genes de linhagem germinativa da cadeia leve da imunoglobulina humana V κ e V λ expressas são como ilustradas nas Figuras 21 e 22. Com exceção dos subgrupos κ 1a, λ 1a, λ 3a, e λ 3c há um resíduo Glu-Asp pareando nas posições 81 e 82 em todas, sequências gênicas de linhagem germinativa V κ e V λ (figuras 21 e 22). Além disso, uma segunda linhagem germinativa que codificou o pareamento de Glu-Asp nas posições 50 e 51 é única para o gene de linhagem germinativa V λ 6. Dessa forma, V λ 6 Wil contém tanto os pares de Glu-Asp 50 a 51 como 81 a 82. As cadeias laterais dos resíduos 50 e 51 são ambas acessíveis na superfície de V λ 6 Wil, como mostrado pela cristalografia de raio x (figura 24). Ao contrário, somente a cadeia lateral Glu81 é exposta na superfície e a cadeia lateral Asp82 é parcialmente incorporada e parece interagir (por interações eletrostáticas ou por ligação de H) com as cadeias laterais de Lys79 e Arg61 (figura 25).

[000302] Com base nestas análises da estrutura de cristal de raio x e a disponibilidade relativa das cadeias laterais de Glu-Asp, os Requerentes concluem que o Glu81 incorporado torna-se acessível já que o domínio introduzido em uma estrutura agregada (por exemplo, fibrilar) (ou torna-se parcialmente desnaturado), dessa forma expondo o que é de outra maneira um epítopo escondido, críptico.

Exemplo VI. Análise da Ligação do Anticorpo Monoclonal Anti-AA a

V λ 6.

A. Ressonância de plásmons de superfície

[000303] Ressonância de plásmons de superfície foi usada para estabelecer a cinética de ligação de vários anticorpos monoclonais com fibrilas e monômero V λ 6 Wil. Em uma concentração de 6,6 nM, os 3 anticorpos ligados às fibrilas V λ 6 Wil sintéticas imobilizadas com um KD de ~ 1 nM - um valor comparável com aquele encontrado para sua reatividade com fibrilas AA murinas (figura 26). A deflexão (expressa em RU) durante a fase de ligação foi similar para os mAbs 7D8 e 2A4 mas foi 50% mais baixa para 8G9. Isto sugere que a densidade deste anticorpo nas fibrilas fosse mais baixa do que os outros 2 reagentes, já que as afinidades calculadas foram similares para os 3 anticorpos. Um mAb de IgG1 serviu como um controle e não exibiu ligação a fibrilas V λ 6 Wil.

[000304] Titulação do mAb 7D8 ao longo da faixa de 6,6 nM a 33,3 nM produziu a redução esperada na deflexão máxima associada com *kon* (figura 27). Em geral, a cinética de ligação foi similar em cada concentração, embora neste teste piloto, o valor de KD para 7D8 em 26,6 nM realmente diferenciou-se daquele obtido em outras concentrações.

[000305] Para avaliar a especificidade da reação e assegurar que a ligação de mAbs com as fibrilas ocorreu através da interação clássica F(ab)-antígeno (ao contrário da ligação mediada por Fc ou adsorção não específica), os dados de ligação foram adquiridos na presença do peptídeo imunógeno (p39) em 20 e 1 μ g/mL (figura 8). O peptídeo p41 que não se liga ao mAb 7D8 em baixas concentrações, serviu como um controle. Na presença de peptídeo p41 20 μ g/mL, a cinética de ligação de mAb 7D8 com fibrilas V λ 6 Wil foi idêntica a 7D8 sozinho. Ao contrário, o peptídeo imunógeno p39 em 1 μ g/mL causou redução > 2 vezes no ponto de ligação como julgado pela deflexão do sinal medido

(figura 28). Inibição da ligação de fibrila por 7D8 foi quase completamente inibida quando 20 µg/mL do peptídeo p39 foram usados. Estes dados indicaram que mAb 7D8 ligou-se a fibrilas através da região da molécula F(ab) já que esta interação pode ser completamente inibida pelo peptídeo imunógeno.

[000306] A reatividade do mAb 7D8 com o monômero Vλ6 imobilizado em um chip foi examinada usando BIAcore. O anticorpo não reagiu com a proteína monomérica. Estes dados indicam que o sítio de ligação reconhecido pelo mAb 7D8 está presente nas fibrilas, mas não na proteína precursora solúvel, implicando que o antígeno seja de natureza conformacional ou críptico.

B. Imunohistoquímica

[000307] Imunohistoquímica foi realizada como se segue: 6 µm de seções espessas, cortadas de blocos fixados em formalina, introduzidos na parafina, foram submetidos à recuperação antigênica por incubação com CitraPlus (BioGenex, San Ramon, CA) por 30 min a 90°C. Tecidos foram imunomarcados com uma solução de 3 µg/mL de mAbs 2A4, 7D8 ou 8G9. O mAb IgG2a TY11 serviu como um controle. Um anticorpo Ig de cavalo anticamundongo conjugado a HRPO (ImmPRESS Universal Reagent, Vector Labs, Burlingame, CA) foi usado como reagente secundário. Lâminas foram desenvolvidas usando 3,3'-diaminobezideno (Vector Labs) e examinadas usando um microscópio Leica DM500. A interação dos anticorpos monoclonais com depósitos de tecidos amiloide ALκ e ALλ também foi estudada usando imunohistoquímica. Como ilustrado na figura 29, depósitos amiloides na glândula tireóide de um paciente que foram compostos de fragmentos λ2 foram imunomarcados por 7D8, 2A4 e 8G9. As áreas de reatividade correlacionadas com depósitos amiloides, indicados pela birrefringência ouro-verde vista na seção tecidual marcada com Congo Red. A reatividade mais impressionante foi

alcançada com os mAbs 7D8 e 2A4 enquanto 8G9, embora positivo, foi consideravelmente mais fraco. Estes dados qualitativos correspondem bem com as análises por BIAcore em que 8G9 ligou-se menos a fibrilas V λ 6 Wil do que os outros 2 reagentes (figura 26). O isotipo combinado com mAb TY11 que serviu como um controle não exibiu imunorreatividade amiloide.

A sequência de aminoácidos desta preteína λ 2 (SEQ ID N^o: 86) (mostrada abaixo) contém os resíduos de linhagem germinativa Asp e Glu codificados na posição 81 e 82, respectivamente.

```

1          11          21          27d   35
GSVVTQPPS VSGAPRQTVA ISCSGSSSNI GNNAVN WYQQLPGKAP
45          55          65          73          83
KVLIIYYDDL PAGVSDRFSG SKSGTSAS LAIRGLQSED EGDYYCAAWD
93
DSLAL

```

[000308] O exame de depósito de tecido amiloide AL κ revelou 2A4, e em um menor grau 7D8 e 8G9, ter reatividade positiva. Novamente houve concordância entre a imunomarcagem e birefringentes regiões amiloides, congofílicas. O mAb TY11 foi não reativo.

[000309] C. Radiovisualização Amiloidoma AI usando 7D8 marcado com ¹²⁵I

[000310] O modelo experimental *in vivo* de amiloidoma AL foi usado para estudar se mAb 7D8 radiomarcado seria visualizaria amiloide AL humana. A eficiência de radiomarcagem de 7D8, como determinada por SDS-PAGE, revelou que tanto as cadeias de IgH como de IgL incorporaram a marcação de I-125, e nenhuma evidência de bandas associadas com fragmentação ou agregação foi observada. A visualização de SPECT/CT de um camundongo carregando amiloidoma AL induzido revelou que o anticorpo marcado com ¹²⁵I localizou-se na massa amiloide induzida, dorsalmente localizada, como evidenciado pelo acúmulo de anticorpos radiomarcados na

amiloide, em relação a tecidos sem amiloide (por exemplo, fígado, coração, baço e rins). mAb IgG radiomarcado irrelevante não se acumulou na massa; entretanto radioiodo livre foi observado acumular-se na tireóide, indicativo de catabolismo e desalogenação do anticorpo IgG. A distribuição do mAb ¹²⁵I-7D8 nos camundongos carregando amiloidoma foi quantificada pela medida da atividade associada com a massa amiloide comparada com aquela de fígado, baço, rim, estômago, coração e pulmão. Estes dados confirmaram o estudo de visualização por SPETC/CT. Em 72h pós-injeção (tempo no qual as imagens foram adquiridas e os tecidos coletados), o amiloidoma continha ID de ~8% que é ~ 4 vezes mais alta do que aquela vista no fígado - sítio do catabolismo de mAb - e no coração onde a atividade de agrupamento do sangue residual seria esperado ser alto. A atividade mostrada no pulmão foi devida ao modo de eutanásia (dados não mostrados).

[000311] Para confirmar os dados de biodistribuição, o amiloidoma bem como fígado, baço, coração e rins foram coletados e seções de tecido preparadas para a análise autorradiográfica. Radiomarcção foi realizada como se segue: o anticorpo 7D8 foi marcado com 2 mCi de ¹²⁵I livre de redutor (Perkin Elmer) que usa quantidades limitantes de Cloramina T e suspenso em PBS contendo 5 mg/ml de albumina sérica bovina (BSA/PBS). O isótopo não ligado e os agregados proteicos foram removidos por cromatografia líquida por exclusão de tamanho por uma coluna Ultrogel AcA34 (Amersham Pharmacia). As frações contendo monômero de IgG foram agrupadas para experimentos de visualização. O rendimento do radioquímico foi ~50%, fornecendo uma atividade específica de ~25 µCi/µg. mAb marcado com ¹²⁵I foi submetido a SDS/PAGE (géis de 10%) na presença ou na ausência de um agente redutor e analisado com um visualizador de fósforo Cyclone. Conforme a visualização por SPECT e medidas de

biodistribuição, autoradiografias confirmaram o acúmulo significativo de ^{125}I -7D8 no amiloidoma, em relação ao fígado. Não houve evidência da entrada de anticorpo 7D8 radiomarcado com ^{125}I em qualquer outro órgão (além da atividade hepática esperada com o catabolismo do anticorpo). Embora mAb 7D8 fosse relativamente uniformemente distribuído em todas as partes do volume da massa amiloide, uma densidade moderadamente mais alta foi observada nas áreas periféricas no limite abdômen-amiloidoma. Não houve entrada de IgG controle radiomarcada em qualquer órgão.

D. Sumário e Conclusões

[000312] Ressonância de plásmons de superfície, imunohistoquímica e radiovisualização *in vivo* estabelecem que os anticorpos 2A4, 7D8 e 8G9 reativos para AA se ligam ao amiloide e fibrilas AL ($K_d \sim 1 \text{ nM}$) derivados de cadeias leves da imunoglobulina. Esta interação provavelmente ocorre nos aminoácidos Asp e Glu altamente conservados na posição 81 e 82, respectivamente, que formam um epítipo linear críptico que fica exposto somente quando a cadeia leve amiloidogênica é incorporada nas fibrilas.

Exemplo VII. Análise de ELISA Demonstra Ligação de Anticorpo a Peptídeos X_1EDX_2 .

[000313] Análise por BIAcore foi realizada para avaliar a ligação de anticorpos 2A4, 7D8 e 8G4 em peptídeos de várias sequências. Como mostrado abaixo na Tabela 4, foi encontrado que os anticorpos reagem com peptídeos tendo a sequência X_1EDX_2 . Curiosamente, os anticorpos não reagiram com peptídeos tendo resíduos C-terminais adicionais. Isto sugere que os anticorpos se ligam especificamente a um neoepítipo gerado da clivagem de SAA para gerar uma extremidade C-terminal livre. Entretanto, como demonstrado no Exemplo V, a extremidade livre não é essencial para ligação estes anticorpos a VL6 Wil, mas de preferência um domínio X_1EDX_2 adota

uma conformação favorável para a ligação aos anticorpos como introduz uma estrutura agregada (por exemplo, fibrilar) (ou torna-se parcialmente desnaturada), expondo um epitopo de outra maneira escondido, críptico.

Tabela 4

| Anticorpo | Peptídeo | pos/neg |
|-----------|--|------------|
| 2A4(39) | CGGHEDT, (SEQ ID N ^o : 87) | POS |
| 40 | CGGAEDS, (SEQ ID N ^o : 88) | pos |
| 41 | GHEDTIADQE, (SEQ ID N ^o : 89) | NEG |
| 64 | CGGAEDT, (SEQ ID N ^o : 90) | POS |
| 65 | CGGHADT, (SEQ ID N ^o : 91) | FRACO |
| 66 | CGGHEAT, (SEQ ID N ^o : 92) | NEG |
| 67 | CGGHEDA, (SEQ ID N ^o : 93) | POS |
| 68 | CGGHEDTM, (SEQ ID N ^o : 94) | NEG |
| 69 | CGGHEDTMA, (SEQ ID N ^o : 95) | NEG |
| 70 | CGGHEDTMAD, (SEQ ID N ^o : 96) | NEG |
| 71 | CGGHED, (SEQ ID N ^o : 97) | FALSO POS? |
| 7d8 (39) | CGGHEDT, (SEQ ID N ^o : 87) | POS |
| 40 | CGGAEDS, (SEQ ID N ^o : 88) | POS |
| 41 | GHEDTIADQE, (SEQ ID N ^o : 89) | NEG |
| 64 | CGGAEDT, (SEQ ID N ^o : 90) | POS |
| 65 | CGGHADT, (SEQ ID N ^o : 91) | NEG |
| 66 | CGGHEAT, (SEQ ID N ^o : 92) | NEG |
| 67 | CGGHEDA, (SEQ ID N ^o : 93) | POS |
| 68 | CGGHEDTM, (SEQ ID N ^o : 94) | NEG |
| 69 | CGGHEDTMA, (SEQ ID N ^o : 95) | NEG |
| 70 | CGGHEDTMAD, (SEQ ID N ^o : 96) | NEG |
| 71 | CGGHED, (SEQ ID N ^o : 97) | NEG |
| 8g4 (39) | CGGHEDT, (SEQ ID N ^o : 87) | POS |

| Anticorpo | Peptídeo | pos/neg |
|-----------|--|----------|
| 40 | CGGAEDS, (SEQ ID N ^o : 88) | POS |
| 41 | GHEDTIADQE, (SEQ ID N ^o : 89) | NEG |
| 64 | CGGAEDT, (SEQ ID N ^o : 90) | POS |
| 65 | CGGHADT, (SEQ ID N ^o : 91) | NEG |
| 66 | CGGHEAT, (SEQ ID N ^o : 92) | NEG |
| 67 | CGGHEDA, (SEQ ID N ^o : 93) | FRACO |
| 68 | CGGHEDTM, (SEQ ID N ^o : 94) | FALSO +? |
| 69 | CGGHEDTMA, (SEQ ID N ^o : 95) | FALSO +? |
| 70 | CGGHEDTMAD, (SEQ ID N ^o : 96) | NEG |
| 71 | CGGHED, (SEQ ID N ^o : 97) | NEG |

Exemplo VIII. Análise Imuno-histoquímica de Camundongo AA.

[000314] A reatividade de sobrenadantes de hibridomas expressando anticorpos 2A4, 8G9 e 7D8 para depósitos amiloides hepáticos e esplênicos AA murino (os principais sítios de deposição amiloide) foi documentada imuno-histoquimicamente. Para estes estudos, seções teciduais coletadas de um camundongo TRIAD com amiloide AA espalhado no fígado e baço (como evidenciado por depósitos birrefringentes verdes Congofílicos) foram marcadas com sobrenadantes contendo mAb. Todos os 3 ligaram-se da amiloide hepática e esplênica. Ao contrário não houve reatividade com sobrenadantes de cultura derivados de hibridomas irrelevantes. A capacidade do amiloide usando 2A4, 8G9 e 7D8 para imunomarcção de amiloide em fígado murino fresco (não fixado), fígado e baço murinos embebidos em OCT foi testada. Houve evidência de que os mAbs conservaram sua capacidade de ligação à amiloide AA no sinusoide hepático. Além disso, a reatividade de anticorpo com o tecido esplênico foi mais fácil de interpretar, e o amiloide perifolicular foi intensamente imunomarcado. Para demonstrar que os mAbs estavam especificamente ligados ao amiloide AA, os sobrenadantes

de mAb em uma diluição 1:25 foram pré-incubados com 50 µg/mL de peptídeo n^o39 (p n^o39) ou de n^o41 (p n^o41) por 1h à temperatura ambiente. Com tecido fixado em formalina como um substrato, o peptídeo p n^o39 (50 µg/mL) inibiu significativamente a reatividade de amiloide de ambos os mAbs 2A4 e 7D8 (os resultados com 8G9 estão pendentes). Ao contrário, o peptídeo p n^o41 foi ineficaz. Resultados comparáveis foram obtidos com tecidos frescos.

Exemplo IX. Análise Imunohistoquímica de AA Humana.

[000315] Comparação da sequência de aminoácidos de SAA de camundongo e humana da posição 73 a 76 revela 2 resíduos idênticos, uma substituição conservada de Ser para Thr, e uma troca não conservada de Ala para His. Para testar se os mAbs 2A4, 8G9 e 7D8 reagiriam cruzadamente com depósitos amiloides AA humanos, testamos sua reatividade em rim, glândula suprarrenal, ovário e fígado humanos contendo AA. Em todos os casos, os sobrenadantes de mAb imunomarcaram os depósitos amiloides. No tecido ovariano, o peptídeo p n^o39 bloqueou efetivamente a ligação de mAbs à AA amiloide perivascular, ao passo que o peptídeo p n^o41 não inibiu esta reação.

Exemplo X. Interação de Sobrenadantes de Cultura Anti-AA com Fibrilas AA Derivadas de Murino.

[000316] A interação dos mAbs 2A4, 8G9 e 7D8 com amiloide AA foi inicialmente testada por ELISA e os dados, fornecidos na Figura 31, analisadas usando SigmaPlot (SPSS Inc) . Cada ponto representa média ± SE (n = 3). Um sobrenadante de cultura de um hibridoma irrelevante foi usado como um controle (Controle de Sobrenadante de Cultura). Houve uma razão ruído-sinal extremamente baixa e os resultados mostraram que a primeira coleta continha mais mAb em relação à segunda, como evidenciado pelo maior sinal de absorvância em relação ao sobrenadante controle. (Além disso, a reatividade imuno-histoquímica do material do

dia 1 foi maior do que nas amostras do dia 2). Embora os valores de SE fossem grandes, pareceu a partir destes dados que a afinidade de ligação de 2A4, 8G9 e 7D8 foi aproximadamente equivalente à reatividade ausente após diluição ~1:64. Os dados de ligação também sugerem que a capacidade, isto é, a quantidade de mAb ligado, variou com 7D8 > 8G9 > 2A4; entretanto, estes dados não foram corrigidos para a concentração de mAb e em estudos subsequentes esta tendência não foi observada. Por causa do baixo sinal e alta variabilidade encontrada nos sobrenadantes de cultura e para determinar mais exatamente a afinidade de ligação relativa dos mAbs às fibrilas amiloides AA murinas e humanas (bem como fornecer material para estudos de biodistribuição *in vivo*) foi necessário isolar os mAbs por cromatografia por afinidade em proteína A. A pureza do mAbs isolados foi estabelecida por SDS-PAGE usando géis de acrilamida 10% em condições redutoras e não redutoras (figura 32). Amostras nas colunas 1 a 4 tratadas com mercaptoetanol, linhas 5 a 9 sem. O gel foi marcado com azul de Coomassie: mAb 8G9, colunas 1 e 6; mAb 2A4, colunas 2 e 7; mAb 7D8, colunas 3 e 8; sobrenadante controle SP2/0, colunas 4 e 9; branco, coluna 5. Marcadores de proteína Mr. (Pad) estão, ordenados do superior para o inferior: 176, 119, 75, 49, 39, 25 e 19 kDa. A interação dos mAbs purificados com peptídeo de imunização p nº39, peptídeo controle (p nº41), extratos de AA murinos e humanos foram determinados por ELISA como descrito acima. Estes dados foram analisados pelo ajuste de uma curva sigmoideal usando o programa SigmaPlot e a concentração de mAb em saturação de 50% (EC50), (Tabela 5) determinada.

Tabela 5

Valores de EC₅₀ para ligação de mAb purificado

| Substrato | | | |
|-----------|-----------|------------------------------------|-------------|
| mAb | AA humana | AA de camundongo Peptídeo 39 (AEF) | Peptídeo 41 |

| | | | | |
|-----|---------|---------|--------|-----------|
| 8G9 | 31,7 nM | 5,64 nM | 4,0 nM | >> 100 nM |
| 2A4 | 26,4 nM | 4,09 nM | 3,4 nM | >> 100 nM |
| 7D8 | 13,3 nM | 1,84 nM | 2,3 nM | >> 100 nM |

[000317] A interação dos 3 mAbs com o peptídeo p nº39 exibiu ligação saturável com valores de EC50 em baixa faixa nanomolar (ver Tabela 5 acima). Ao contrário, até na concentração mais alta de mAb usada (100 nM) houve pouca ligação detectável ao peptídeo p nº41 (figura 33 - Cada ponto representa média \pm SE, (n = 3 em cada concentração)). Estes dados confirmaram os resultados imunohistoquímicos descritos acima, isto é, aquele peptídeo p nº39 foi capaz de bloquear completamente a ligação de mAbs aos tecidos carregados com amiloide AA. As EC50s calculadas a partir da ligação de cada mAb com o peptídeo p nº39 foram essencialmente idênticas como foi no caso quando um extrato amiloide AA murina foi usado como substrato (figura 34 - Cada ponto representa média \pm SE (n = 3 em cada concentração)). Os valores de EC50 calculados a partir de ligação de mAbs ao extrato de AA de camundongo foram essencialmente idênticos aos obtidos quando o peptídeo p nº39 foi usado como substrato (figura 34; Tabela 5). Ao contrário, quando o extrato amiloide AA humana foi seco nos poços da microplaca, os valores de EC50 foram entre 5 e 7× menores do que aqueles observados para AA de camundongo e peptídeo p nº39 (figura 35 - Cada ponto representa média \pm SE (n = 3 em cada concentração); Tabela 5). Como o valor de EC50 para ligação de mAb 7D8 foi o mais baixo dos 3 anticorpos testados, os Requerentes selecionaram este reagente para estudos de visualização e colocalização *in vivo*. As 2 substituições de aminoácido na sequência de SAA humana com relação à proteína murina afetaram os valores de EC50. Não desejando estar ligados por uma teoria específica, os Requerentes atribuem a EC50 maior para AA humana a um pior "ajuste" das cadeias laterais de aminoácidos no sítio de ligação ao antígeno.

Entretanto, este efeito corresponde somente a uma redução de 5 vezes na afinidade relativa quando os extratos amiloides são adsorvidos pela superfície, como no ELISA. Além disso, estes dados apoiam a observação de que os 3 mAbs se ligaram tanto aos depósitos amiloides AA de tecido murino como aos humanos.

Exemplo XI. Ligação Competitiva de Mabs à Amiloide AA de Camundongo e Humana.

[000318] Para determinar o efeito, se houver algum, da desnaturação potencial quando adsorvido à superfície do poço de microtítulo, a reatividade de 2A4, 8G9 e 7D4 foi avaliada usando um ELISA de competição no qual o extrato amiloide AA murino ou humano foi usado como um competidor solúvel para a interação de mAbs com o extrato de AA ligada à superfície.

[000319] Em todos os casos, fibrilas amiloides AA solúveis (não adsorvidas) tanto de origem humana como de camundongo foram capazes de competir pelos 3 mAbs, indicando que o epitopo reconhecido pelos reagentes não depende da desnaturação parcial que resulta da adsorção superficial. Em geral, o extrato de AA murina (AEF) foi um competidor melhor do que a AA humana (Tabela 6).

Tabela 6

Valores de IC₅₀ (µg/mL) da ligação de mAb à amiloide AA

| mAb | AA humana [†] | AA de camundongo (AEF) [‡] |
|-----|------------------------|-------------------------------------|
| 8G9 | > 119,5 | 17,3 |
| 2A4 | > 211,7 | 14,7 |
| 7D8 | > 811,1 | 26,8 |

[†]Amiloide AA humana em solução competindo por AA de camundongo (AEF) adsorvida;

[‡]AA de camundongo (AEF) em solução competindo pelo extrato amiloide AA humano adsorvido na placa.

[000320] Os valores de IC₅₀ (concentração de AA (por peso) que reduziu a ligação de mAb em 50%) para AEF murina na solução foram

~20 µg/mL, ao passo que para AA humana os valores foram 6 a 44 vezes maiores (ao contrário, as EC50s de AA humana foram somente 7 vezes menores do que aquelas para a AA de camundongo). Isto pode refletir o fato de que, quando em solução, o epitopo nas fibrilas amiloides é menos acessível em preparações de AA humana comparadas com AA murina.

[000321] Como esperado, o mAb 7D8 que exibiu a maior afinidade relativa por fibrilas AA humanas e murinas quando foram adsorvidas pela superfície requereu a concentração mais alta da amiloide AA para alcançar a competição.

Exemplo XII. mAb 7D8 radiomarcado.

[000322] A eficiência da radiomarcagem de 7D8 foi determinada por SDS-PAGE. MAb reduzidos e nativos foram analisados e as proteínas visualizadas usando um visualizador de fósforo. Tanto cadeias IgH como IgL incorporaram a marcação com I-125, e nenhuma evidência de bandas associadas com fragmentação ou agregação foi observada.

Exemplo XIII. Visualização de amiloide AA usando 7D8 marcado com ¹²⁵I.

[000323] Para estudar a localização *in vivo* de mAb 7D8 radiomarcado, três grupos de camundongos foram usados: IL-6 transgênico; AgNO₃/AEF induzido, e controles sem amiloide (Selvagem). A visualização por SPECT/CT revelou que mAb ¹²⁵I-7D8 localizou-se em depósitos amiloides AA murinos no baço e fígado, como evidenciado pelo acúmulo do mAb radiomarcado nestes tecidos em relação ao camundongo controle, que mostrou somente baixa atividade de agrupamento sanguíneo no fígado e iodo livre na glândula tireoide.

[000324] Em contraste com estes camundongos, o camundongo injetado com AgNO₃ mostrou entrada de iodo livre na tireoide, alguma atividade hepática, mas o sítio principal de ligação de ¹²⁵I-7D8 foi visto

no sítio de injeção s.c. de AgNO₃ (área dorsal direita inferior). A atividade nesta área é claramente circunscrita pela solução de prata atenuadora de raio x como visto por CT. O mAb 7D8 foi mostrado ligar-se a depósitos amiloides AA tanto no fígado como no baço na presença de sAA circulante no camundongo TRIAD, como evidenciado nas imagens de SPECT.

A. Biodistribuição De ¹²⁵I-7D8 Em Camundongos.

[000325] 48 h pós-injeção de ¹²⁵I-7D8 havia radioatividade no agrupamento sanguíneo, que contabilizou entrada relativamente alta no pulmão (que se enchem de sangue quando os camundongos são sacrificados). Importante, o acúmulo hepatoesplênico de mAb em camundongo IL-6 é indicativo de presença do amiloide. As imagens de SPECT/CT confirmaram a distribuição de mAb nestes órgãos. 72 h pós-injeção, os valores de agrupamento sanguíneo modificaram-se pouco como evidenciado pela atividade inalterada no coração e pulmão em relação aos camundongos sacrificados em 48 h, devido a T_{1/2bio} relativamente longa deste mAb (~60 h). Houve acúmulo significativo de mAb radiomarcado no camundongo IL-6, que correlacionou-se com as imagens de SPECT que foram adquiridas mostrando impressionante entrada esplênica e, em um menor grau, hepática. De outros órgãos, o mais importante foi o fígado (que é o sítio do catabolismo de IgG e fonte de sAA durante a resposta de fase aguda). Nos camundongos selvagens, sem desafio inflamatório ou amiloide, o fígado continha < 6% ID/g, que é comparável ao rim e coração onde o agrupamento sanguíneo contribui quase exclusivamente para o sinal.

B. Análises Autorradiográficas E Histoquímicas.

[000326] A fim de determinar se o acúmulo hepático aumentado de ¹²⁵I-7D8 nos camundongos IL-6 e AgNO₃ resultou da entrada amiloide, depuração catabólica ou ligação de sAA recentemente sintetizada,

fígado bem como outros tecidos foram submetidos à análise autorradiográfica.

[000327] Com base na visualização por SPECT e medidas de biodistribuição, foi suposto que maior quantidade de amiloide nos camundongos IL-6 transgênicos estava no fígado e baço. Esta suposição foi confirmada em seções marcadas com Congo Red nas quais amiloide significativa foi observada em todas as partes da polpa vermelha bem como nas regiões perivasculares e sinusoides do fígado. Depósitos birrefringentes adicionais, mais discretos estavam presentes nos rins e coração. A distribuição de ^{125}I -7D8 dentro destes tecidos também se correlacionaram com o material Congo Red e reativo para AA. Não houve acúmulo em hepatócitos que foram destituídos de amiloide.

[000328] Com base nos dados de biodistribuição, o camundongo tratado com AgNO_3 tinha mais entrada de ^{125}I -7D8 no fígado do que no baço, que foi inesperado uma vez que isto não é o padrão normal de acúmulo de AA em tais animais. Marcação com Congo Red revelou pequenas quantidades amiloides em uma região perifolicular única no baço (canto direito superior) e depósito perivascular hepático extenso, ambos os quais foram evidentes nas autorradiografias. Adicionalmente, o sítio de injeção s.c. de AgNO_3 foi visto nas imagens de SPECT tendo uma concentração significativa de ^{125}I -7D8 (também observamos isto quando SAP radioiodetada foi usada como agente de visualização). Este sítio não contém amiloide (isto é, material Congo Red birrefringente); entretanto, foi imunomarcado pelo mAb anti-AA. Sem desejar estar ligado a uma teoria específica, é possível que mAb 7D8 localize-se nos sítios de inflamação ou "pré-amiloides" (bem como depósitos amiloides maduros). Em contraste com o impressionante acúmulo de 7D8 nos órgãos de camundongo IL-6, foi encontrado que os tecidos dos camundongos controle tinham muito pouco ou nada de

traçador em qualquer órgão além do agrupamento sanguíneo. Nenhuma amiloide foi achada nas seções marcadas com Congo red de qualquer órgão destes controles.

C. Farmacocinética de ^{125}I -7D8.

[000329] Após injeção do anticorpo 7D8 radiomarcado, a taxa de desaparecimento da molécula foi determinada e as determinações de meia-vida resumidas na Tabela 7. Estes resultados indicaram que $T_{1/2\text{bio}}$ de 7D8 foi ~60 h, compatível com aquela de um mAb IgG2b murino (nota, 7D8 é da subclasse IgG2b). A depuração ligeiramente mais rápida de ^{125}I -7D8 nos camundongos IL-6 (TRIAD) não foi considerada significativa. Com base nestes dados, a retenção de mAb pela amiloide tecidual, como evidenciado nos dados de SPECT, por 72 h não influenciam na taxa de excreção.

Tabela 7

análise da meia-vida de ^{125}I -7D8 em camundongos

| Camundongo | A (S.E.) | K (S.E. x 10^{-4}) | R^2 | $t_{1/2\text{ bio}}$ | $t_{1/2\text{ ef}}$ |
|-------------------------|--------------|-----------------------|-------|----------------------|---------------------|
| IL-6, 48h | 191,7 (2,96) | 0,0117 (7,0) | 0,98 | 59,2 h | 56,2 |
| IL-6, 72h | 175,2 (3,99) | 0,012 (8,9) | 0,97 | 57,7 h | |
| AgNO ₃ , 48h | 181,0 (1,99) | 0,0106 (4,9) | 0,99 | 65,3 h | 61,1 |
| AgNO ₃ , 72h | 174,1 (2,97) | 0,0112 (5,8) | 0,98 | 62,2 h | |
| Ctrl, 48h | 185,1 (3,19) | 0,0108 (7,6) | 0,98 | 64,3 h | 61,3 |
| Ctrl, 72h | 185,1 (3,09) | 0,0109 (5,6) | 0,98 | 63,7 h | |

1. Método de Identificação de Agentes que Previnem ou Tratam Amiloidose Usando Camundongo Transgênico ou TRIAD. Procedimentos para preparação de agentes são descritos em Schenk et al. *Nature* 400:173-177. Agentes são emulsionados 1:1 (v/v) com o adjuvante completo de Freund para a primeira imunização de camundongos transgênicos, seguida por um reforço em adjuvante completo de Freund em 2 semanas e mensalmente após isso. Injeções de PBS seguiram o mesmo esquema e os camundongos foram injetados com mistura de PBS/adjuvante 1:1 para controle. A

sobrevida dos camundongos transgênicos é comparada para determinar se os agentes são eficazes na prevenção de Amiloidose AA aumentando a vida do animal.

2. Histopatologia. Para microscopia ótica e polarizada, seções de tecido de 4 a 6 μm de espessura foram cortadas e marcadas com hematoxilina e eosina (HE) e uma solução alcalina de Congo Red recentemente preparada, respectivamente. Para a microscopia eletrônica de transmissão, as seções foram introduzidas em Epon (Ted Pella, Redding, CA), seccionadas, e examinadas com um microscópio eletrônico de transmissão JEOL 100S. Ver Ludlage et al. *Vet Pathol* 42:117-124 (2005).

3. Imuno-histoquímica. Seções de tecido introduzido em parafina (6 μm de espessura) foram cortadas em um micrótomo, montadas em lâminas recobertas com poli-L-lisina, secas durante a noite à temperatura ambiente, e desparafinizadas. Imunomarcação foi realizada usando a técnica do complexo avidinabiotina (ABC-elite) como descrito anteriormente. Os anticorpos primários foram antisoros de camundongo antiamilóide A humana (Accurate Chemical and Scientific Corporation, Westbury, NY) e anti-SAA de camundongo policlonais. Imunoglobulina-G (IgG) de cavalo anti-camundongo purificada por afinidade conjugada à peroxidase de rábano silvestre (Vector Laboratories, Burlingame, CA) ou IgG de cabra anticoelho, -camundongo ou -rato conjugada a peroxidase de rábano silvestre (BioRad Laboratories, Richmond, CA) foram usadas como anticorpos secundários.

4. Quantificação de SAA por ELISA. Concentrações de SAA foram medidas por um ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) usando o conjunto Multispecies SAA ELISA de acordo com as orientações fornecidas pelo fabricante (Biosource, Camarillo, CA). Curvas-padrão foram preparadas usando quantidades conhecidas de

proteína SAA humana e absorvância foi medida em 405 nm com leitor de placa modelo 4450 da BioRad (Fullerton, CA).

5. Estudos de Renovação por Cintilografia de SAP radiomarcada em Camundongos. SAP foi oxidativamente iodetada com ^{125}I (2 a 5 MBq/mg) pelo uso de N-bromossuccinimida. Camundongos de 6 a 12 semanas receberam 2 a 10 μg de ^{125}I -SAP em 200 μL intravenosamente. Sangrias de cauda precisamente medidas (0,01 a 0,04 g) foram tomadas em intervalos de tempo específicos e radioatividade precipitável em ácido tricloroacético foi contada na mesma corrida no fim de cada experimento em conjunto com alíquotas-padrão do traçador injetado. Pepys et al. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 91:5602-5606 (1994).

6. Renovação por Cintilografia de SAP radiomarcada e Estudos de Visualização no Homem. SAP para uso no homem foi isolada do plasma de um doador acreditado normal único e foi oxidativamente iodetada com ^{125}I (2 a 5 MBq/mg) ou ^{123}I (110 MBq/50 μg de proteína) usando N-bromossuccinimida. Após injeção de ^{123}I SAP, os dados foram adquiridos e processados em uma câmera gama IGE Starcam (IGE Medical Systems, Slough, UK). A depuração de SAP marcada com ^{125}I foi estudada em indivíduos saudáveis e pacientes sofrendo de amiloidose AA. Pepys et al. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 91:5602-5606 (1994).

7. Extração e Purificação de Amiloide. Os métodos usados para extrair a amiloide do tecido foram como descritos por Pras et al. Ver Pras et al. *J. Clin. Invest.* 47:924-933 (1968). Em resumo, uma porção do fígado ou tecidos de outros órgãos obtidos em necropsia e mantidos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi homogeneizada com salina gelada em um banho de gelo usando um misturador Omni (Omni Internacional, Waterbury, CT). O extrato foi centrifugado em 10.000 rpm por 30 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o precipitado re-extraído mais duas vezes com salina gelada, uma vez

com citrato de sódio 0,1 M salina Tris-tamponada, pH 8,0, e então novamente com salina até que a A280 do sobrenadante fosse <0,10. O precipitado resultante foi homogeneizado com água destilada gelada, e a mistura centrifugada em 35.000 rpm por 3 horas a 4 C. O precipitado obtido do extrato de água foi então liofilizado.

8. Ressonância de plásmons de superfície. A cinética de ligação foi medida em uma ferramenta BIAcore X. As fibrilas preparadas a partir de Vλ6 Wil foram sonicadas ligeiramente com uma sonda sonicadora e então ligadas a um chip CM-5 usando química de amina, de acordo com o protocolo BIAcore. Este processo utiliza EDC e NHS para ativar os grupos carboxila do chip para acoplamento com os grupos amino livres das fibrilas. O acoplamento foi conduzido em um tampão de NaOAc, pH 4,0 em uma concentração de 100 µg/mL. O canal controle foi "ligado vazio" e ambos os canais foram reagidos com etanolamina para saturar os sítios não reagidos. Aproximadamente 16.000 RU de fibrilas Vλ6 Wil foram ligadas.

[000330] Sensogramas foram dirigidos no tampão HBS-EP de BIAcore em 20 µL/min no Fc1 (fibrilas Vλ6 Wil) menos modo Fc-2 (controle). Amostras contendo mAb ou mAb mais inibidores de peptídeo foram injetadas (70 µL) e sensogramas coletados usando a função de lavagem retardada por 200 segundos. Os dados foram analisados no programa BIAevaluation, usando o modelo de Langmuir 1:1 com correção de ação de massa.

9. MicroSPECT/CT. Duas coortes de 3 camundongos cada uma foram injetadas s.c. com 50 mg do extrato amiloide de AL humana entre as escápulas. Após 7 dias, um grupo de camundongos recebeu uma injeção iv na veia da cauda de ~ 300 µCi de mAb 7D8 marcado com ¹²⁵I. O segundo grupo foi administrado e quantidade igual de mAb murino MOPC 31C como um controle. Após 72 horas, os camundongos foram sacrificados por dose excessiva de isoflurano e

imagens de SPECT/CT adquiridas. Para fornecer o aumento de contraste vascular nas imagens CT, foi dada aos camundongos uma dose iv de 200 μ L de Fenestra VC® (Advanced Research Technologies, Montreal, Canadá) 5 minutos antes da varredura.

[000331] Os dados de SPECT foram coletados com uma plataforma de visualização microCAT II + SPECT de modalidade dual (Siemens Preclinical Solutions, Knoxville, TN), capaz de resolução espacial submilimétrica quando equipado com um orifício de colimador de diâmetro de poro de 0,5 mm. Na visualização, os 2 detectores (compostos de um tubo foto-multiplicador multianodo Hamamatsu R2486-02 de diâmetro 50 mm ligado a uma tabela de arranjo cristalino de 1 × 1 x 8 mm CsI (TI) em uma grade de 1,2 mm²) foi posicionada ~45 mm do centro da rotação. Cada conjunto de dados de SPECT compreendeu 45 projeções coletadas em 360° durante o curso de ~50 minutos. As imagens foram reconstruídas usando uma implementação do algoritmo de probabilidade máxima de maximização de expectativa (EM-ML).

[000332] Após coleta de dados por SPECT, imagens CT de alta resolução foram obtidas. O microCAT II scanner tem uma geometria de raio de cone de órbita circular, equipada de uma fonte de raio x de microfoco de 20 a 80 kVp, e captura um campo de 60 mm × 90 mm da visão usando um detector CCD 2048 x 3072 de tabela, opticamente ligado a uma tela de fósforo minR através de um pacote de fibra ótica. Cada conjunto de dados CT, composto de 360 projeções em azimutes de 1°, foi adquirido em 8 minutos. As imagens foram reconstruídas em tempo real em voxels isotrópicos de 77 μ m usando uma implementação do algoritmo de retroprojeção de Feldkamp.

[000333] Para facilitar o corregristo do SPECT reconstruído e imagens CT, fontes de Co-57 seladas foram colocadas no leito de visualização. Os conjuntos de dados microSPECT e CT foram

visualizados e corregistrados manualmente com um pacote de programa de análise de imagem 3D (Amira, Versão 3.1: Mercury Computer Systems).

10. Biodistribuição. Amostras de fígado, baço, rim, coração, pulmão e tumores amiloides implantados (isto é, amiloidoma) foram coletadas dos camundongos e colocadas em frascos tarados, pesados, e a radioatividade medida. Os valores de índice primário foram expressos como % da dose de tecido injetado/g (% ID/g).

11. Autorradiografia. Seções de cortes de 6 µm de espessura de blocos fixados em formalina, introduzidos em parafina de tecido obtido de camundongos sacrificados 72 h pós-injeção de ¹²⁵I-7D8 foram colocados nas lâminas de microscópio Probond (Fisher Scientific), mergulhadas em emulsão NTB-2 (Eastman Kodak), armazenadas no escuro, e reveladas após uma exposição de 24h. As seções foram contramarcadas com hematoxilina e eosina (H&E), usando cobertura Permunt (Fisher Scientific), e examinadas por microscopia ótica. Além disso, a lâmina consecutiva foi marcada com Congo Red alcalino e examinada sob iluminação cruzada polarizada. Finalmente, uma terceira lâmina foi imunomarcada usando como reagente primário o nosso mAb reativo para AA. Imagens microscópicas da câmera digital foram tomadas e avaliadas usando um pacote de programas de análise de imagem (Imagem Pro Plus, Media, Cybernetics).

Exemplo XIV. Preparação de Anticorpos Humanizados 2A4 e 7D8.

[000334] Anticorpos 2A4, 7D8 e 8G9 humanizados foram preparados pelo enxerto de CDRs de 2A4, 7D8 e 8G9 murinas em regiões conservadas aceptoras humanas de acordo com técnicas conhecidas na técnica. Retromutações foram feitas para reduzir a antigenicidade conservando a afinidade de ligação. As regiões variáveis da cadeia leve e cadeia pesada de 2A4 murino são apresentadas como os resíduos 20 a 131 da SEQ ID Nº: 152 e como os resíduos 20 a 138 da

SEQ ID Nº: 154, respectivamente. As regiões variáveis da cadeia leve e cadeia pesada de 7D8 são apresentadas como os resíduos 20 a 131 da SEQ ID Nº: 153 e como os resíduos 20 a 138 da SEQ ID Nº: 154, respectivamente. As regiões variáveis da cadeia leve de 2A4 e 8G9 murino são idênticas entre si e diferenciam-se da região variável da cadeia leve de 7D8 em um resíduo único na CDR1. As regiões variáveis da cadeia pesada de cada um de 2A4, 7D8, e 8G9 são idênticas.

[000335] A variável capa (Vk) de 2A4 e 7D8 pertence ao subgrupo 2 de camundongo, que corresponde ao subgrupo 2 humano e a variável pesada (Vh) ao subgrupo 3c de camundongo que corresponde ao subgrupo 3 humano (Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. Publicação do NIH Nº 91-3242). CDR-L1 inclui 16 resíduos e pertence à classe 4 canônica em Vk. CDR-L2 inclui 7 resíduos e pertence à classe 1 em Vk. CDR-L3 inclui 9 resíduos e pertence à classe 1 em Vk. Ver Martin AC, Thornton JM. (1996) J Mol Biol. 263, 800-15. A leucina na posição 27 no 7D8 é bastante incomum, e a glutamina no 2A4 é mais habitual. Um modelo mostra que a cadeia lateral está na superfície do sítio de ligação, e por isso deve ser importante para a ligação ao antígeno. CDR-H1 inclui 5 resíduos e pertence à classe 1, e CDR-H2 inclui 19 resíduos e pertence à classe 4 (Martin & Thornton, 1996). CDR-H3 não tem nenhuma classe canônica, mas a alça 8 do resíduo provavelmente tem uma base ligada de acordo com as regras de Shirai et al. (1999) FEBS Lett. 455, 188-97. Este é conservado em um modelo embora a conformação do ápice da CDR-H3 possa ser diferente. Os resíduos na interface entre os domínios Vk e Vh são aqueles comumente encontrados em Vk de 2A4, Vk de 7D8 e Vh de 2A4.

[000336] Uma busca foi feita no banco de dados PDB (Deshpande et al. (2005) Nucleic Acids Res. 33: D233-7) para encontrar estruturas

que guiariam a escolha de retromutações. Uma busca no banco de dados de sequência proteica não redundante do NCBI permitiu a seleção de regiões conservadas humanas adequadas em que enxertar as CDRs murinas. Para Vk, uma cadeia leve capa humana com código de acesso no NCBI BAC01562 (gi:21669075) (SEQ ID Nº: 166) foi escolhida. Esta tem o mesmo comprimento de CDR-L3 e pertence à linhagem germinativa humana VKIIA19/A3 e subgrupo capa humano 2. Uma região conservada similar que somente se diferenciou na região J também foi encontrada com o código de acesso no NCBI BAC01733 (gi:21669417) (SEQ ID Nº: 167). BAC01562 foi usada como uma região conservada para Vk de 2A4, e BAC01733 foi usada como uma região conservada para Vk de 7D8. Para Vh, a cadeia pesada de Ig humana AAC51024 (gi:1791061) (SEQ ID Nº: 165) foi usada. Ver Glas et al. (1997) *Clin. Exp. Immunol.* 107: 372-380. Esta pertence à linhagem germinativa humana VH3-72 e subgrupo pesado humano 3.

[000337] Regiões variáveis da cadeia leve representativas humanizadas de 2A4 são apresentadas como as SEQ ID Nºs: 155, 156 e 157. Regiões variáveis da cadeia leve representativas humanizadas 7D8 são apresentadas como as SEQ ID Nºs: 158, 159, 160, 174, 175 e 176. Regiões variáveis da cadeia pesada representativas humanizadas 2A4/7D8 são apresentadas como as SEQ ID Nºs: 161, 162 e 163. Ver figuras 36A a 36E.

[000338] Anticorpos representativos humanizados da invenção incluem anticorpos que têm uma região variável da cadeia leve selecionada a partir de um dos resíduos 20 a 131 da SEQ ID Nº: 152, resíduos 20 a 131 da SEQ ID Nº: 153, e SEQ ID Nºs: 155, 156, 157, 157, 159, 160, 174, 175 e 176; e uma região variável da cadeia pesada selecionada a partir de um dos resíduos 20 a 138 da SEQ ID Nº: 154 e SEQ ID Nºs: 161, 162 e 163.

Exemplo XV. Efeitos Terapêuticos de MAb 2A4 em Camundongos com

Amiloidose AA Sistêmica Severa.

[000339] A eficácia terapêutica de mAb 2A4 foi avaliada em camundongos H2/huIL-6 com amiloidose sistêmica severa. Camundongos H2/huIL-6 transgênicos, que constitutivamente expressam um transgene de IL-6 humana, tendem a amiloidose AA sistêmica rápida e irrevogável. Em um primeiro e segundo estudo, camundongos tratados com mAb combinado com isotipo TY-11, que não tem nenhuma atividade relatada em camundongos, foi usado como um controle. Antes de administrar o fator de aumento amiloide para induzir AA, camundongos H2/huIL-6 foram escolhidos e sangrados através do seio retro-orbital, o soro preparado, e a concentração de sAA determinada usando um conjunto ELISA comercialmente disponível. Os valores representativos foram como se segue: 2196,7 µg/mL, 823,91 µg/mL, 1415,00 µg/mL, 1673,01 µg/mL, 814,53 µg/mL, 1088,18 µg/mL, 736,34 µg/mL, 1546,35 µg/mL, 953,70 µg/mL, 886,46 µg/mL, média = 1213,4 ± 478 µg/mL.

[000340] No início do segundo estudo (semana 0), camundongos H2/huIL-6 foram injetados iv com 100 µg do fator de aumento amiloide (AEF). Após indução da patologia de AA pela injeção de AEF, aos camundongos foram administradas 5 injeções de 100 µg subcutaneamente em membros alternados de mAb 2A4 (13 animais) ou TY11 (11 animais). A terapia foi iniciada em aproximadamente 1 semana após a injeção de AEF. A sobrevida dos animais em cada grupo de tratamento foi traçada e analisada. Os resultados são mostrados na Tabela 7. Somente 45% dos camundongos tratados com mAb TY11 sobreviveram até o fim do estudo. Ao contrário, nenhum dos camundongos tratados com 2A4 foi perdido ao longo do curso do estudo. A análise dos dados de sobrevida usando métodos-padrão mostrou uma diferença significativa nas curvas de sobrevida ($P < 0,0025$) em ambos os grupos. A sobrevida mediana dos

camundongos tratados com TY11 foi calculada para ser 41 dias, comparável com aquela observada em um estudo prévio (38,5 dias).

Tabela 7

| Porcentagem de animais sobreviventes | | |
|--------------------------------------|-------------------|------------------|
| Dias pós-injeção | Tratados com TY11 | Tratados com 2A4 |
| 0 | 100,00 | 100,00 |
| 22 | 81,82 | 100,00 |
| 33 | 72,73 | 100,00 |
| 37 | 63,64 | 100,00 |
| 41 | 45,45 | 100,00 |
| 42 | 45,45 | 100,00 |

[000341] Na semana 6, pós-AEF, os camundongos foram sangrados e sacrificados, e seus órgãos coletados para análise adicional. Para a quantificação amiloide no fígado e baço, birrefringência de Congo Red foi visualizada microscopicamente sob iluminação cruzada polarizada e digitalmente registrada. A área do material birrefringente foi determinada pela seleção (usando um método de segmentação espectral) e a quantificação dos pixels associados a amiloide. O índice de carga amiloide (ABI), medida a partir do conteúdo amiloide, foi expresso como a área percentual ocupada pela amiloide em cada órgão. A quantificação de amiloide nos fígados e baços de camundongos tratados com 2A4 e com TY11 não revelou nenhuma diferença significativa entre os dois tratamentos. Entretanto, os camundongos tratados com TY11 que sobreviveram ao dia 42 para comparação com camundongos tratados com 2A4 foram aqueles que não desenvolveram um grau mórbido ou distribuição de amiloide AA para resultar por meio disso em morbidez. A carga amiloide hepatoesplênica também é monitorada durante o curso do estudo de sobrevida para avaliar um aumento na carga amiloide correlacionada com a morbidez.

[000342] Em um terceiro estudo, mAb 2A4 em comparação ao mAb

JH70 combinado ao isotipo, que não tem nenhuma reatividade relatada em camundongos. Além disso, a química sanguínea e outros parâmetros foram monitorados ao longo do período de tratamento. Camundongos machos e fêmeas H2/huL-6 nascidos entre 1/8/08 e 7/9/08 foram usados neste estudo. Vinte e três camundongos fêmeas e 16 camundongos machos foram sangrados através do seio retro-orbital. Sangue total foi usado para a caracterização química do nitrogênio de ureia sanguínea (BUN) e alanina aminotransferase (ALT) para medir a função renal e hepática usando VetScan VS2 (Abaxis, Union City, CA). A concentração sérica de 12 outras proteínas e analitos foi simultaneamente medida. Uma contagem de sangue total (CBC) foi realizada usando a plataforma VetScan HM5. Além disso, a cada camundongo foi administrada uma dose baixa (~50 a 60 μ Ci) de componente amiloide P sérico humano radioiodetado (125 I-SAP) em albumina sérica bovina 5 mg/mL para avaliar a carga amiloide dos camundongos antes do início do processo de doença. O percentual de 125 I-SAP conservado em 24 h pós-injeção (pi) foi medido colocando cada camundongo em um calibrador de dose. A retenção de 125 I-SAP maior do que aquela observada nos camundongos não transgênicos (controle) foi indicativa de doença amiloide. Finalmente, soro foi usado para medir a concentração da proteína amiloide sérica (sAA) usando um ensaio ELISA comercial. Um sumário destes dados pré-tratamento, valores de química sanguínea selecionados, e os tratamentos dados a cada camundongo é mostrado abaixo nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8

Sumário dos Dados Pré-tratamento E Terapia com MAb De Cada Animal

| Camundongo # | conc. de sAA (μ g/mL) | Sexo | DOB | Retenção de 125 I-SAP (%) | Terapia (Grupo N ^o) |
|--------------|----------------------------|------|--------|--------------------------------|---------------------------------|
| 3488 | 360 | F | 1/8/08 | 9 | 2A4 (1) |
| 3489 | 996 | F | 1/8/08 | 29 | 2A4 (1) |

| Camundongo # | conc. de sAA (µg/mL) | Sexo | DOB | Retenção de ¹²⁵ I-SAP (%) | Terapia (Grupo Nº) |
|-------------------|-------------------------|------|---------|---|-----------------------|
| 3490 | 472 | F | 1/8/08 | 10 | 2A4 (1) |
| 3492 | 2068 | M | 1/8/08 | 13 | 2A4 (1) |
| 3493 | 1740 | M | 1/8/08 | 11 | JH70 (1) |
| 3494 | 1272 | M | 1/8/08 | 10 | JH70 (1) |
| 3495 | 1436 | M | 1/8/08 | 13 | JH70 (1) |
| 3496 | 2080 | M | 1/8/08 | 9 | 2A4 (1) |
| 3498 | 268 | M | 1/8/08 | 9 | 2A4 (1) |
| 3500 | 700 | F | 11/8/08 | 11 | JH70 (1) |
| 3501 | ND | F | 11/8/08 | 9 | JH70 (1) |
| 3503 | 1040 | F | 11/8/08 | 11 | JH70 (1) |
| 3504 | 960 | F | 11/8/08 | 10 | JH70 (1) |
| 3513 ¹ | 4400 | M | 13/8/08 | 60 | 2A4 (1) |
| 3514 ¹ | 4400 | M | 13/8/08 | 40 | 2A4 (1) |
| 3515 | 2800 | M | 13/8/08 | 13 | 2A4 (1) |
| 3521 | 1480 | M | 18/8/08 | 11 | 2A4 (1) |
| 3524 | 1680 | M | 18/8/08 | 9 | 2A4 (1) |
| 3549 | 720 | F | 6/9/08 | 9 | 2A4 (2) |
| 3550 | 760 | F | 6/9/08 | 9 | 2A4 (2) |
| 3552 ² | 0 | F | 6/9/08 | 11 | 2A4 (2) |
| 3553 | 1160 | F | 6/9/08 | 12 | 2A4 (2) |
| 3558 | 1660 | M | 6/9/08 | 9 | JH70 (2) |
| 3559 | 3520 | M | 6/9/08 | 12 | JH70 (2) |
| 3562 | 1312 | F | 6/9/08 | 11 | JH70 (2) |
| 3563 | 1120 | M | 6/9/08 | 9 | JH70 (2) |
| 3564 | 2512 | M | 6/9/08 | 11 | 2A4 (2) |
| 3565 | 1960 | M | 6/9/08 | 10 | 2A4 (2) |
| 3567 | 1880 | F | 6/9/08 | 12 | 2A4 (2) |
| 3570 | 792 | F | 7/9/08 | 13 | 2A4 (2) |
| 3573 | 700 | F | 7/9/08 | 8 | 2A4 (2) |
| 3577 ² | 0 | F | 7/9/08 | 10 | 2A4 (2) |

| Camundongo # | conc. de sAA (µg/mL) | Sexo | DOB | Retenção de ¹²⁵ I-SAP (%) | Terapia (Grupo Nº) |
|-------------------|----------------------|------|--------|--------------------------------------|--------------------|
| 3578 ² | 0 | F | 7/9/08 | 9 | 2A4 (2) |
| 3579 | 1120 | F | 7/9/08 | 10 | 2A4 (2) |
| 3580 ² | 0 | F | 7/9/08 | 8 | JH70 (2) |
| 3581 | 700 | F | 7/9/08 | 9 | JH70 (2) |
| 3582 | 1680 | F | 7/9/08 | 9 | JH70 (2) |
| 3583 | 804 | F | 7/9/08 | 9 | JH70 (2) |
| 3584 | 1040 | F | 7/9/08 | 14 | JH70 (2) |

1, animais IL-6 homozigotos com altos níveis de sAA e doença amiloide precoce em vida.

2, camundongos selvagens sem sAA circulante e nenhuma doença amiloide. Retenção de ¹²⁵I-SAP nestes animais é considerada normal e não reflete carga amiloide.

Tabela 9

Valores Normais de Parâmetros de Química Sanguínea em Camundongos H2/huIL-6

| | BUN (mg/dL) | | GLI (mg/dL) | | ALT (U/L) | | ALB (g/dL) | | TP (g/dL) | | GLOB (g/dL) | |
|---------|-------------|------|-------------|-------|-----------|-------|------------|-----|-----------|-----|-------------|-----|
| | F | M | F | M | F | M | F | M | F | M | F | M |
| Média | 21,1 | 23,8 | 144,7 | 151,2 | 37,6 | 42,3 | 2,5 | 1,9 | 5,6 | 6,2 | 3,1 | 4,4 |
| DP | 4,0 | 2,7 | 14,0 | 17,6 | 16,3 | 24,3 | 0,3 | 0,4 | 0,2 | 0,6 | 0,4 | 0,6 |
| n | 18 | 13 | 18 | 13 | 18 | 13 | 18 | 13 | 18 | 13 | 18 | 13 |
| Alto | 28,0 | 30,0 | 184,0 | 179,0 | 79,0 | 105,0 | 3,0 | 2,6 | 6,0 | 7,4 | 3,7 | 5,8 |
| Baixo | 15,0 | 20,0 | 126,0 | 119,0 | 21,0 | 23,0 | 2,0 | 1,2 | 5,1 | 5,5 | 2,6 | 3,4 |
| Mediana | 20,0 | 24,0 | 143,0 | 154,0 | 32,5 | 32,0 | 2,4 | 1,9 | 5,6 | 6,0 | 3,2 | 4,3 |

BUN, nitrogênio de ureia sanguínea; GLI, glicose; ALT, alanina aminotransferase; ALB, albumina; TP, proteína sérica total; GLOB, imunoglobulina; F, fêmea; M, macho; DP, desvio-padrão; n é o número de camundongos usados para determinar os valores.

[000343] No início do terceiro estudo (semana 0), todos os camundongos H2/huIL-6 receberam 100 µg iv de fator de aumento amiloide (1 mg/mL). Uma semana depois disso, a terapia começou e a

cada camundongo foram administrados 100 µg de mAb 2A4 ou JH70 sc como delineado na Tabela 8. As injeções de mAb continuaram semanalmente por 7 semanas.

[000344] Em 2 sem medidas pós-AEF, CBC, química sanguínea e sAA sérica foram feitas usando sangue coletado através do seio retro-orbital. Neste tempo também, os camundongos no grupo 1 foram administrados com ~ 60 µCi de ¹²⁵I-SAP em BSA como antes, para avaliar o acúmulo amiloide como evidenciado pela retenção de SAP radiomarcada. Vários dos animais mostraram um efeito adverso de sofrimento extremo, e por isso, a avaliação de ¹²⁵I-SAP usando carga amiloide foi descontinuada. Os resultados de parâmetros de química sanguínea selecionados, adquiridos 2 semanas pós-AEF são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10

| | BUN (mg/dL) | | GLI (mg/dL) | | ALT (U/L) | | ALB (g/dL) | | TP (g/dL) | | GLOB (g/dL) | |
|---------|-------------|-------|-------------|-------|-----------|-------|------------|-----|-----------|------|-------------|-----|
| | F | M | F | M | F | M | F | M | F | M | F | M |
| Média | 31,4 | 52,1 | 145,1 | 129,8 | 33,9 | 63,3 | 2,3 | 1,8 | 6,5 | 8,1 | 4,2 | 6,2 |
| DP | 24,3 | 39,1 | 16,6 | 25,6 | 6,9 | 30,6 | 0,3 | 0,5 | 1,0 | 1,7 | 1,1 | 1,5 |
| n | 15 | 13 | 15 | 13 | 15 | 13 | 15 | 13 | 15 | 13 | 15 | 12 |
| Alto | 100,0 | 159,0 | 177,0 | 178,0 | 46,0 | 134,0 | 2,7 | 3,0 | 8,6 | 11,7 | 7,0 | 9,6 |
| Baixo | 16,0 | 20,0 | 104,0 | 82,0 | 22,0 | 32,0 | 1,7 | 1,0 | 5,2 | 6,0 | 3,1 | 4,5 |
| Mediana | 22,0 | 31,0 | 150,0 | 120,0 | 32,0 | 54,0 | 2,3 | 1,7 | 6,5 | 7,5 | 4,0 | 6,0 |

BUN, nitrogênio de ureia sanguínea; GLI, glicose; ALT, alanina aminotransferase; ALB, albumina; TP, proteína sérica total; GLOB, imunoglobulina; F, fêmea; M, macho; DP, desvio padrão; n é o número de camundongos usados para determinar os valores.

[000345] Em 8 semanas pós-AEF, os camundongos foram sangrados um tempo final e imediatamente após isso foram administrados ~200 µCi de ¹²⁵I-SAP usando soro de camundongo normal 5% como veículo. Em resposta a este tratamento, alguns animais mostraram algum comportamento incomum que diminuíram em 30 min. Vinte e quatro horas depois, os camundongos foram injetados com agente de contraste de raio X de CT (~ 200 µL iv na

veia da cauda) e então foram sacrificados por dose excessiva de isoflurano. Imagens de emissão de fóton única (SPECT) e de raio X (CT) tomográficas de cada animal foram adquiridas. Os órgãos foram coletados e a quantidade de radioatividade em cada amostra foi calculada e expressa como % de dose injetada por grama de tecido. Adicionalmente, uma porção de cada tecido foi fixada durante a noite em formalina tamponada em preparação para o seccionamento e análise microscópica.

[000346] Durante as 7 sem de estudo de terapia, 2 camundongos foram achados mortos e 3 camundongos foram sacrificados porque foram considerados improváveis de sobreviver durante a noite e tinham um escore de condição corporal desfavorável (<2 ; associado com perda de peso $> 15\%$). Camundongos que experimentaram uma reação adversa à injeção de ^{125}I -SAP e 1 camundongo que foi sacrificado devido a complicações que resultaram de um sangramento retro-orbital não foram avaliados como parte da análise de sobrevida. A sobrevida dos camundongos em cada grupo de tratamento com mAb é mostrada na Tabela 11.

Tabela 11

| Porcentagem de animais sobreviventes | | |
|--------------------------------------|--------------------|------------------|
| Dia pós-injeção | Tratados com TY11- | Tratados com 2A4 |
| 0 | 100,00 | 100,00 |
| 41 | | 100,00 |
| 42 | | 100,00 |
| 53 | 85,71 | 100,00 |
| 55 | 71,43 | 100,00 |
| 56 | 64,29 | 100,00 |
| 57 | 64,29 | 100,00 |

[000347] Aproximadamente 65% dos tratados camundongos com mAb JH70 que foram avaliáveis sobreviveram ao fim do estudo. Ao contrário, nenhum dos camundongos tratados 2A4 que foram

avaliáveis morreu durante os 57 dias. A análise dos dados de sobrevida usando os métodos padrão demonstrou uma diferença significativa nas curvas de sobrevida ($P=0,015$ usando teste de Cox-Mantel e $P=0,016$ usando o teste de Wilcoxon Grehan-Breslow).

[000348] Os dados de química sanguínea finais foram analisados de acordo com a terapia que cada camundongo recebeu. Por causa de diferenças nos valores de parâmetro médios associados com camundongos H2/huLL-6 machos e fêmeas (no momento do sacrifício, os níveis de BUN em camundongos fêmeas foram mais altos tanto para camundongos tratados com 2A4 como tratados com JH70), somente os camundongos fêmeas que sobreviveram estão incluídos na Tabela 12 abaixo.

Tabela 12

| | BUN (mg/dL) | | GLI (mg/dL) | | ALT (U/L) | | ALB (g/dL) | | TP (g/dL) | | GLOB (g/dL) | |
|---------|-------------|-------|-------------|-------|-----------|-------|------------|------|-----------|------|-------------|------|
| | 2A4 | JH70 | 2A4 | JH70 | 2A4 | JH70 | 2A4 | JH70 | 2A4 | JH70 | 2A4 | JH70 |
| Média | 60,7 | 73,3 | 107,8 | 100,1 | 45,5 | 119,7 | 2,3 | 2,2 | 9,2 | 9,1 | 7,0 | 7,1 |
| DP | 27,2 | 25,7 | 27,0 | 13,3 | 6,2 | 123,1 | 0,5 | 0,6 | 1,5 | 1,5 | 2,0 | 2,1 |
| n | 6,0 | 7,0 | 6,0 | 7,0 | 6,0 | 7,0 | 6,0 | 7,0 | 6,0 | 7,0 | 6,0 | 7,0 |
| Alto | 95,0 | 120,0 | 160,0 | 123,0 | 52,0 | 381,0 | 2,9 | 3,0 | 11,7 | 11,9 | 10,1 | 10,6 |
| Baixo | 17,0 | 36,0 | 83,0 | 83,0 | 35,0 | 33,0 | 1,5 | 1,2 | 7,2 | 7,5 | 4,3 | 5,3 |
| Mediana | 66,5 | 70,0 | 99,5 | 98,0 | 46,5 | 65,0 | 2,2 | 2,1 | 9,1 | 8,9 | 7,1 | 6,2 |

[000349] BUN, nitrogênio de ureia sanguínea; GLI, glicose; ALT, alanina aminotransferase; ALB, albumina; TP, proteína sérica total; GLOB, imunoglobulina; F, fêmea; M, macho; DP, desvio padrão; n é o número de camundongos usados para determinar os valores.

[000350] Camundongos tratados com 2A4 mostraram níveis séricos de nitrogênio de ureia sanguínea (BUN) e alanina aminotransferase (ALT) reduzidos em comparação com camundongos tratados com JH70. BUN e ALT são marcadores de função renal e hepática, respectivamente, e seus níveis reduzidos indicam que a função do órgão pode ter sido mais bem conservada pelo tratamento com 2A4.

PARA: ESCRITÓRIO INTERNACIONAL DE OMPI

34, chemin des Colombettes

1211 Geneva 20

Suíça

No. de Fac-símile: +44 22 338 82 70

Pedido de Patente No.: PCT/US2008/088493

Depósito: 29 de dezembro de 2008

Requerente: Elan Pharmaceuticals, Inc.

Título: TRATAMENTO E PROFILAXIA DE AMILOIDOSE

TOTAL DE PÁGINAS: 5

* * * * *

REFERÊNCIA A MATERIAL BIOLÓGICO DEPOSITADO

DE ACORDO COM A REGRA 13bis

De acordo com a regra 13 de Regulamentos sob o Tratado de Cooperação de Patente, o requerente desde já submete detalhes do material biológico referenciado de acordo com o Tratado de Budapeste, as linhagens celulares que produzem anticorpos monoclonais 2A4 e 7D8 são depositadas no American Type Culture Collection ("ATCC®") que se situa na 10801, University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, Estados Unidos da América.

O hibridoma murino JH807D8.29.19.47 ("7D8") foi depositado em 5 de setembro de 2008 e atribuído o No. de Depósito no ATCC® PTA-9648. A linhagem celular JH802A4.20.44.77 ("2A44") foi depositada em 17 de dezembro de 2008 e atribuído o No. de Depósito no ATCC® PTA-9662. Cópias dos certificados do depósito são submetidas juntamente.

Os anticorpos monoclonais 2A4 e 7D8, e anticorpos humanizados e quiméricos preparados destes, são referenciados no pedido de patente originalmente depositado.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo humanizado ou quimérico de ocorrência não natural ou fragmento de ligação ao antígeno deste, caracterizado pelo fato de que se liga especificamente a um epitopo dentro dos resíduos 70 a 76 da SEQ ID N^o: 2.

2. Anticorpo humanizado ou quimérico de ocorrência não natural ou fragmento de ligação ao antígeno deste, caracterizado pelo fato de que compete pela ligação ao peptídeo A amiloide humano com o anticorpo 2A4 (número de acesso ATCC 9662).

3. Anticorpo humanizado ou quimérico de ocorrência não natural ou fragmento de ligação ao antígeno deste, caracterizado pelo fato de que compete pela ligação ao peptídeo A amiloide humano com um anticorpo que tem uma região variável de cadeia leve apresentada como resíduos 20 a 131 da SEQ ID N^o: 152 e uma região variável de cadeia pesada apresentada como resíduos 20 a 138 da SEQ ID N^o: 154.

4. Anticorpo humanizado ou quimérico de ocorrência não natural ou fragmento de ligação ao antígeno deste, caracterizado pelo fato de que compete pela ligação ao peptídeo A amiloide humano com o anticorpo 7D8 (número de acesso ATCC 9468).

5. Anticorpo humanizado ou quimérico de ocorrência não natural ou fragmento de ligação ao antígeno deste, caracterizado pelo fato de que compete pela ligação ao peptídeo A amiloide humano com um anticorpo tendo uma região variável de cadeia leve apresentada como resíduos 20 a 131 da SEQ ID N^o: 153 e uma região variável de cadeia pesada apresentada como resíduos 20 a 138 da SEQ ID N^o: 154.

6. Anticorpo humanizado ou quimérico de ocorrência não natural ou fragmento de ligação ao antígeno deste, caracterizado pelo fato de que é uma versão humanizada ou quimérica do anticorpo 2A4

(número de acesso ATCC 9662) ou uma versão humanizada ou quimérica do anticorpo 7D8 (número de acesso ATCC 9468).

7. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia leve compreendendo três regiões de determinação de complementaridade de uma região variável de cadeia leve de 2A4 apresentada como resíduos 20 a 131 da SEQ ID N^o: 152 ou três regiões de determinação de complementaridade de uma região variável de cadeia leve de 7D8 apresentada como resíduos 20 a 131 da SEQ ID N^o: 153.

8. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos um resíduo de região conservada de cadeia leve selecionado a partir do grupo consistindo em L87 e L90 (convenção da numeração Kabat) ocupado por Y e F, respectivamente, em que o resto da região variável de cadeia leve é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável de cadeia leve de imunoglobulina aceptora humana.

9. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos um resíduo de região conservada de cadeia leve selecionado a partir do grupo consistindo em +7, +14, +15, +17, +18, +50, +75, +88, + 92 e +109 (numeração linear) ocupado por T, S, L, D, Q, K, Y, L, F e L, respectivamente, em que o resto da região variável de cadeia leve é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável de cadeia leve de imunoglobulina aceptora humana.

10. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos um resíduo de região conservada de cadeia

leve selecionado a partir do grupo consistindo em +75 e +92 (numeração linear) ocupado por Y e F, respectivamente, em que o resto da região variável de cadeia leve é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável de cadeia leve de imunoglobulina aceptora humana.

11. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a região variável de cadeia leve de imunoglobulina aceptora humana sendo uma região variável de cadeia leve humana subgrupo capa 2 (convenção de Kabat).

12. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a região variável de cadeia leve subgrupo 2 humana sendo da linhagem germinativa humana VKIIA19/A3.

13. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a região variável de cadeia leve subgrupo 2 humana da linhagem germinativa humana VKIIA19/A3 sendo uma sequência apresentada como SEQ ID Nº: 166 ou 167.

14. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como resíduos 20 a 131 da SEQ ID Nº: 152, resíduos 20 a 131 da SEQ ID Nº: 153, ou apresentada como SEQ ID Nº: 155, 156, 157, 158, 159, 160, 174, 175, ou 176.

15. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo três regiões de determinação de complementaridade de uma região

variável de cadeia pesada de 2A4 apresentada como resíduos 20 a 138 da SEQ ID Nº: 154.

16. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos um resíduo de região conservada de cadeia pesada selecionado a partir do grupo consistindo em H37, H49, H70 e H93 (Convenção de numeração Kabat) ocupado por I, A, F ou V, respectivamente, em que o resto da região variável de cadeia pesada é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina aceptora humana.

17. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos um resíduo de região conservada de cadeia pesada selecionado a partir do grupo consistindo em H37, H49, H70 e H93 (Convenção de numeração Kabat) ocupado por I, A, F ou V, respectivamente, em que o resto da região variável de cadeia pesada é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina aceptora humana.

18. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos um resíduo de região conservada de cadeia pesada selecionado a partir do grupo consistindo em +10, +15, +19, +37, +49, +73, +78, +79, +80, +87, +95, +99, +119 (numeração linear) ocupado por R, K, K, I, A, F, Q, S, M, N, M, V ou A, respectivamente, em que o resto da região variável de cadeia pesada é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina aceptora humana.

19. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos um resíduo de região conservada de cadeia

pesada selecionado a partir do grupo consistindo em +10, +15, +19, +37, +49, +73, +78, +79, +80, +87, +95, +99, +119 (numeração linear) ocupado por R, K, K, I, A, F, Q, S, M, N, M, V ou A, respectivamente, em que o resto da região variável de cadeia pesada é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina aceptora humana.

20. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos um resíduo de região conservada de cadeia pesada selecionado a partir do grupo consistindo em +37, +49, +73 e +99 (numeração linear) ocupado por I, A, F ou V, respectivamente, em que o resto da região variável de cadeia pesada é ocupado por um resíduo correspondente em uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina aceptora humana.

21. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a região variável de cadeia pesada de imunoglobulina aceptora humana sendo uma região variável de cadeia pesada humana subgrupo gama 3 (convenção de Kabat).

22. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que a região variável de cadeia pesada humana subgrupo gama 3 sendo uma sequência apresentada como SEQ ID Nº: 165.

23. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como resíduos 20 a 138 da SEQ ID Nº: 154 ou apresentada como SEQ ID Nº: 161, 162, ou 163.

24. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de

acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia leve compreendendo três regiões de determinação de complementaridade de uma região variável de cadeia leve de 2A4 apresentada como resíduos 20 a 131 da SEQ ID N^o: 152 ou três regiões de determinação de complementaridade de uma região variável de cadeia leve de 7D8 apresentada como resíduos 20 a 131 da SEQ ID N^o: 153, e uma região variável de cadeia pesada compreendendo três regiões de determinação de complementaridade de uma região variável de cadeia pesada de 2A4 apresentada como resíduos 20 a 138 da SEQ ID N^o: 154.

25. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia leve compreendendo três regiões de determinação de complementaridade apresentadas como SEQ ID N^{os}: 168, 169 e 170, e uma região variável de cadeia pesada compreendendo três regiões de determinação de complementaridade apresentadas como SEQ ID N^{os}: 171, 172, e 173.

26. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia leve compreendendo três regiões de determinação de complementaridade apresentadas como SEQ ID N^{os}: 177, 169 e 170, e uma região variável de cadeia pesada compreendendo três regiões de determinação de complementaridade apresentadas como SEQ ID N^{os}: 171, 172 e 173.

27. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como resíduos 20 a 131 da SEQ ID N^o: 152 ou resíduos 20 a 131 da SEQ ID N^o: 153, e uma

região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como resíduos 20 a 138 da SEQ ID N°: 154.

28. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID N°: 155, 156, 157, 158, 159, 160, 174, 175, ou 176; e uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID N°: 161, 162 ou 163.

29. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que a região variável de cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID N°: 157, e a região variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID N°: 163.

30. Anticorpo de ocorrência não natural ou fragmento de ligação ao antígeno deste, caracterizado pelo fato de se que se liga especificamente a um epitopo compreendendo X_1EDX_2 em um agregado de proteína amiloide, X_1 é H, T, F, P, A, L, C, Q, R, K, G, V, Y, I ou W, e em que X_2 é T, S, E, R, I, F, A, M, L, N, P, C, Y ou Q.

31. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de se que se liga especificamente a um epitopo compreendendo X_1EDX_2 em um agregado de proteína amiloide, em que X_1 é H ou A e X_2 é T, S ou A.

32. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de se que se liga especificamente a um epitopo consistindo de uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo consistindo em GHEDT (SEQ ID N°: 3), HEDT (SEQ ID N°: 12), AEDS (SEQ ID N°: 13), AEDT (SEQ ID N°: 14), HEDA (SEQ ID N°: 15) e TEDE (SEQ ID N°: 16).

33. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de se que se liga especificamente a proteína amiloide na forma monomérica com uma afinidade de menos de aproximadamente 10^7 M^{-1} .

34. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de se que se liga especificamente a proteína amiloide A sérica (SAA).

35. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de se que se liga especificamente a uma proteína amiloide selecionada a partir do grupo consistindo em proteína de cadeia leve de imunoglobulina, polipeptídeo precursor amiloide de ilhota humana (IAPP), transtirretina (TTR) e ApoA1.

36. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que se liga especificamente a proteína de cadeia leve de imunoglobulina.

37. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que a proteína de cadeia leve de imunoglobulina é V λ 6 Wil.

38. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que a proteína de cadeia leve de imunoglobulina é V κ .

39. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que é um anticorpo humanizado ou quimérico ou fragmento de ligação ao antígeno.

40. Uso de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 39, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento útil no tratamento de amiloidose AA ou amiloidose AL em um indivíduo.

41. Uso, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento útil no tratamento de amiloidose AA ou amiloidose AL em um indivíduo humano.

42. Uso de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 39, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento útil no tratamento profilático de amiloidose AA ou amiloidose AL em um indivíduo.

43. Uso, de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento útil no tratamento profilático de amiloidose AA ou amiloidose AL em um indivíduo humano.

44. Uso de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno que é uma versão humanizada ou quimérica do anticorpo 2A4 (número de acesso ATCC PTA-9662) ou uma versão humanizada ou quimérica do anticorpo 7D8 (número de acesso ATCC PTA-9468), caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para tratamento de amiloidose AA ou amiloidose AL em um indivíduo humano.

45. Uso de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno que é uma versão humanizada ou quimérica do anticorpo 2A4 (número de acesso ATCC PTA-9662) ou uma versão humanizada ou quimérica do anticorpo 7D8 (número de acesso ATCC PTA-9468), caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para tratamento profilático de um indivíduo humano suscetível a amiloidose AA ou amiloidose AL.

46. Uso de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 39, o qual está ligado a uma marcação detectável, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de uma composição útil na detecção de um

depósito amiloide associado com amiloidose AA ou amiloidose AL em um indivíduo.

47. Uso, de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de uma composição útil na detecção de um depósito amiloide associado com amiloidose AA ou amiloidose AL em um indivíduo humano.

48. Uso, de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de a marcação detectável é uma radiomarcação.

49. Uso, de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo fato de a radiomarcação é ^{125}I .

50. Uso de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno que é uma versão humanizada ou quimérica do anticorpo 2A4 (número de acesso ATCC PTA-9662) ou uma versão humanizada ou quimérica do anticorpo 7D8 (número de acesso ATCC PTA-9468), o qual anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno está ligado a uma marcação detectável, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de uma composição para detectar um depósito amiloide associado à agregação de proteína amiloide AA ou proteína amiloide AL em um indivíduo humano.

51. Método para preparar um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, caracterizado pelo fato de sintetizar ou recombinantemente expressar um anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 39 e recuperar o anticorpo.

52. Uso de um anticorpo de ocorrência não natural ou fragmento de ligação ao antígeno compreendendo uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 157 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como a SEQ ID Nº: 163, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para tratamento de amiloidose AA ou amiloidose

AL em um indivíduo humano.

53. Uso de um anticorpo de ocorrência não natural ou fragmento de ligação ao antígeno compreendendo uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 157 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como a SEQ ID Nº: 163, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para tratamento profilático de amiloidose AA ou amiloidose AL em um indivíduo humano.

54. Uso de um anticorpo de ocorrência não natural ou fragmento de ligação ao antígeno compreendendo uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 157 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como a SEQ ID Nº: 163, o qual anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno está ligado a uma marcação detectável, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de uma composição para detectar um depósito amiloide associado à agregação de proteína amiloide AA ou proteína amiloide AL em um indivíduo humano.

55. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 39, e um veículo farmaceuticamente aceitável.

56. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um anticorpo humanizado ou quimérico compreendendo uma versão humanizada ou quimérica do anticorpo 2A4 (número de acesso ATCC PTA-9662) ou uma versão humanizada ou quimérica do anticorpo 7D8 (número de acesso ATCC PTA-9468) e um veículo farmaceuticamente aceitável.

57. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de

que compreende um anticorpo humanizado compreendendo uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como SEQ ID Nº: 157 e uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos apresentada como a SEQ ID Nº: 163 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

58. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 56 ou 57, caracterizado pelo fato de ser formulada para administração parenteral.

59. Hibridoma, caracterizado pelo fato de que expressa anticorpo monoclonal murino 2A4 (número de acesso ATCC PTA-9662).

60. Hibridoma, caracterizado pelo fato de que expressa anticorpo monoclonal murino 7D8 (número de acesso ATCC PTA-9468).

| | | | | | | | |
|-------|------------------|-----|-------------|-------------|------------|-------------|------------|
| HSAA1 | (SEQ ID NO: 98) | 1 | MKLLTGLVFC | SLVLGVSSRS | FFSTLGEAFD | GARDMWRRAYS | DMREANYIGS |
| HSAA2 | (SEQ ID NO: 99) | 1 | MKLLTGLVFC | SLVLGVSSRS | FFSTLGEAFD | GARDMWRRAYS | DMREANYIGS |
| HSAA3 | (SEQ ID NO: 100) | 1 | MKLLTGLVFC | SLVLGVSSQG | WLTFKAAGQ | GAKDMWRAYS | DMKEANYIKS |
| HSAA4 | (SEQ ID NO: 101) | 1 | MRLFTGIIVFC | SLVMGVTSSES | WRSFTKEALQ | GVGDMGRAYW | DIMISNHQNS |
| | | | | | | | |
| HSAA1 | (SEQ ID NO: 98) | 51 | DKYFHARGNY | DAAKRGPGGV | WAAEAISDAR | ENIQRFPGHG | A-----E |
| HSAA2 | (SEQ ID NO: 99) | 51 | DKYFHARGNY | DAAKRGPGGA | WAAEVISNAR | ENIQRLTGHG | A-----E |
| HSAA3 | (SEQ ID NO: 100) | 51 | DKYFHARGNY | DAVQRGPGGV | WATEVISDAR | ENVQRLTGdh | A-----E |
| HSAA4 | (SEQ ID NO: 101) | 51 | NRLLYARGNY | DAAQRGPGGV | WAAKLISRER | vylggldyy | lfgnsstvle |
| | | | | | | | |
| HSAA1 | (SEQ ID NO: 98) | 93 | DSLADQAANE | WGRSGKDPNH | FRPAGLPEKY | | |
| HSAA2 | (SEQ ID NO: 99) | 93 | DSLADQAANK | WGRSGRDPNH | FRPAGLPEKY | | |
| HSAA3 | (SEQ ID NO: 100) | 93 | DSLAGQATNK | WGOSGKDPNH | FRPAGLPEKY | | |
| HSAA4 | (SEQ ID NO: 101) | 101 | DSKSNEKAE | WGRSGKDPDR | FRPDGLPKKY | | |

FIG. 1

| | | | |
|-------|------------------|-----|---|
| HSAAL | (SEQ ID NO: 98) | 1 | mklltglvfc slvlgvsrs FFSFLGEAFD GARDMWRAYS DMREANYIGS |
| HAAL | (SEQ ID NO: 102) | 1 | -----RS FFSFLGEAFD GARDMWRAYS DMREANYIGS |
| HSAAL | (SEQ ID NO: 98) | 51 | DKYFHARGNY DAAKRGPGV WAAEAISDAR ENIQRFPGHG AEDsladqaa |
| HAAL | (SEQ ID NO: 102) | 33 | DKYFHARGNY DAAKRGPGV WAAEAISDAR ENIQRFPGHG AEDS----- |
| HSAAL | (SEQ ID NO: 98) | 101 | newgrsgkdp nhfrpeglpe ky |
| HAAL | (SEQ ID NO: 102) | | ----- |

FIG. 2

| | | | | | | |
|--------------|------------------|-----|-----------------------|------------|------------|------------|
| HSAA2 (alfa) | (SEQ ID NO: 99) | 1 | mklltglvfc slvlsvsrs | FFSFLGEAFD | GARDMWRAYS | DMEANYIGS |
| HAA2 (alfa) | (SEQ ID NO: 103) | 1 | -----RS | FFSFLGEAFD | GARDMWRAYS | DMEANYIGS |
| HSAA2 (alfa) | (SEQ ID NO: 99) | 51 | DKYFHARGNY DAAKRGPGGA | WAAEVISNAR | ENIQRLTGHG | AEDS1adqaa |
| HAA2 (alfa) | (SEQ ID NO: 103) | 33 | DKYFHARGNY DAAKRGPGGA | WAAEVISNAR | ENIQRLTGHG | AEDS----- |
| HSAA2 (alfa) | (SEQ ID NO: 99) | 101 | nkwgrsgrdp nhfrpaglpe | ky | | |
| HAA2 (alfa) | (SEQ ID NO: 103) | | ----- | ----- | --- | |

FIG. 3

| | | | |
|-------|------------------|-----|--|
| HSAA3 | (SEQ ID NO: 100) | 1 | mkltstgiifc slvlgsSQG WLTFLKAAGQ GAKDMWRAYS DMKEANYKKS |
| HAA3 | (SEQ ID NO: 104) | 1 | -----QG WLTFLKAAGQ GAKDMWRAYS DMKEANYKKS |
| | | | |
| HSAA3 | (SEQ ID NO: 100) | 51 | DKYFHARGNY DAVQRGPGGV WATEVISDAR ENVQRLTGDH AEDSLagat |
| HAA3 | (SEQ ID NO: 104) | 33 | DKYFHARGNY DAVQRGPGGV WATEVISDAR ENVQRLTGDH AEDS----- |
| | | | |
| HSAA3 | (SEQ ID NO: 100) | 101 | nkwtgsgkdp nhfrpaglpe ky |
| HAA3 | (SEQ ID NO: 104) | | ----- |

FIG. 4

| | | |
|------------------------|-----|--|
| HSAA4 (SEQ ID NO: 101) | 1 | mrlftgiivc slvmgvtSES WRSFFKEALQ GVGDMGRAYW DIMISNHQNS |
| HAA4 (SEQ ID NO: 105) | 1 | -----ES WRSFFKEALQ GVGDMGRAYW DIMISNHQNS |
| HSAA4 (SEQ ID NO: 101) | 51 | NRYLYARGNY DAAQRPGGV WAKLISRSR VYLQGLIDYY LFGNSstvlE |
| HAA4 (SEQ ID NO: 105) | 33 | NRYLYARGNY DAAQRPGGV WAKLISRSR VYLQGLIDYY LFGNS----- |
| HSAA4 (SEQ ID NO: 101) | 101 | dsksnekaee wgrsgkdpdr frpdglpkky |
| HAA4 (SEQ ID NO: 105) | | ----- |

FIG. 5

| | | | | | | | |
|------|------------------|----|------------|------------|------------|------------|------------|
| HAA1 | (SEQ ID NO: 102) | 1 | RSFFSFLGEA | FDGARDMWRA | YSDMREANYI | GSDKYFHARG | NYDAAKRGPG |
| HAA2 | (SEQ ID NO: 103) | 1 | RSFFSFLGEA | FDGARDMWRA | YSDMREANYI | GSDKYFHARG | NYDAAKRGPG |
| HAA3 | (SEQ ID NO: 104) | 1 | QGWLTFLKAA | GQGAKDMWRA | YSDMKEANYK | KSDKYFHARG | NYDAVQRGPG |
| HAA4 | (SEQ ID NO: 105) | 1 | ESWRSFFKEA | LQGVGDMGRA | YWDIMISNHQ | NSNRYLYARG | NYDAAQRGPG |
| HAA1 | (SEQ ID NO: 102) | 51 | GVWAAEAISD | ARENIOQF-- | ---FGHGA-- | -EDS | |
| HAA2 | (SEQ ID NO: 103) | 51 | GAWAAEVISN | ARENIOQL-- | ---TGHGA-- | -EDS | |
| HAA3 | (SEQ ID NO: 104) | 51 | GVWATEVISD | ARENVOQL-- | ---TGdha-- | -EDS | |
| HAA4 | (SEQ ID NO: 105) | 51 | GVWAAKLISR | SRVYLOGLId | YIIFGNSStv | LEDs | |

FIG. 6

| | | | |
|------|------------------|----|---------|
| HAA1 | (SEQ ID NO: 102) | 70 | GHGAEDS |
| HAA2 | (SEQ ID NO: 103) | 70 | GHGAEDS |
| HAA3 | (SEQ ID NO: 104) | 70 | GHGAEDS |
| HAA4 | (SEQ ID NO: 105) | 78 | styLEDS |

FIG. 7

| | | |
|-------------------------------------|-----|--|
| SAA1 de Camundongo (SEQ ID NO: 106) | 1 | MKLLTSLVFC SLLLGVCCHG FFSFYHEAFQ GAGDMWRAYT DMKEANWKNS |
| SAA2 de Camundongo (SEQ ID NO: 107) | 1 | MKLLTSLVFC SLLLGVCCHG FFSFYHEAFQ GAGDMWRAYT DMKEAGWKDG |
| SAA3 de Camundongo (SEQ ID NO: 108) | 1 | MKPSIAIILC ILLIGVDSQR WYQFMKEAGQ GSFDMWRAYS DMKKANWKNS |
| SAA4 de Camundongo (SEQ ID NO: 109) | 1 | MRLATVIVLC SLFLGVSQDG WYSFFREAVQ GTWDLWRAYR DNLEANYQNA |
| SAA1 de Camundongo (SEQ ID NO: 106) | 51 | DKYFHARGNY DAAQRGPGGV WAAEKISDGR EAFQE----- FFG---RGHE |
| SAA2 de Camundongo (SEQ ID NO: 107) | 51 | DKYFHARGNY DAAQRGPGGV WAAEKISDAR ESFOE----- FFG---RGHE |
| SAA3 de Camundongo (SEQ ID NO: 108) | 51 | DKYFHARGNY DAARRGPGA WAAKVISDAR EAVQK----- FTG---HGAE |
| SAA4 de Camundongo (SEQ ID NO: 109) | 51 | DQYFYARGNY EAQRGSGGI WAAKIISTSR KYFqglllly YFGlrhGLE |
| SAA1 de Camundongo (SEQ ID NO: 106) | 93 | DTIADQEANR HGRSGKDPNY YRPPGLPDKY |
| SAA2 de Camundongo (SEQ ID NO: 107) | 93 | DTWADQEANR HGRSGKDPNY YRPPGLPAKY |
| SAA3 de Camundongo (SEQ ID NO: 108) | 93 | DSRADQFANE WGRSGKDPNH FRPAGLPKRY |
| SAA4 de Camundongo (SEQ ID NO: 109) | 101 | TLQATQKAE WGRSGKKNENH FRPEGLPEKF |

FIG. 8

| | | | |
|-------|------------------|-----|--|
| MSAA1 | (SEQ ID NO: 106) | 1 | mklltslvfc slllgvchgg ffsfvheafq gacdmwrayt dmkeanwnkns |
| MAA1 | (SEQ ID NO: 110) | 1 | -----G ffsfvheafq gacdmwrayt dmkeanwnkns |
| MSAA1 | (SEQ ID NO: 106) | 51 | dkyfhargny daaqrgeggv waaekisdgr eafqefffgrg heditiadqea |
| MAA1 | (SEQ ID NO: 110) | 32 | dkyfhargny daaqrgeggv waaekisdgr eafqefffgrg hedit----- |
| MSAA1 | (SEQ ID NO: 106) | 101 | nrhgrsgkdp nyrrppglpd ky |
| MAA1 | (SEQ ID NO: 110) | | ----- |

FIG. 9

| | | | |
|-------|------------------|-----|--|
| MSAA2 | (SEQ ID NO: 107) | 1 | mklltstlvc slllgvchgG FFSTFGEAFQ GAGDMWRAYT DMKEAGWKDG |
| MAA2 | (SEQ ID NO: 111) | 1 | -----G FFSTFGEAFQ GAGDMWRAYT DMKEAGWKDG |
| MSAA2 | (SEQ ID NO: 107) | 51 | DKYFHARGNY DAAQRGPGGV WAAEKISDAR ESFOEFFFRG HEDTmadgea |
| MAA2 | (SEQ ID NO: 111) | 32 | DKYFHARGNY DAAQRGPGGV WAAEKISDAR ESFOEFFFRG HEDT----- |
| MSAA2 | (SEQ ID NO: 107) | 101 | nhrgrsgkdp nyvzpgglpa ky |
| MAA2 | (SEQ ID NO: 111) | | ----- |

FIG. 10

| | | | | |
|------------------------|-----|----------------------------------|------------|------------|
| MSAA3 (SEQ ID NO: 108) | 1 | mkpsiaiiic ililgvdsqr wvqfmkeagq | GSRDWRAYS | DMKANWKNS |
| MAA3 (SEQ ID NO: 112) | 1 | -----EAGQ | GSRDWRAYS | DMKANWKNS |
| MSAA3 (SEQ ID NO: 108) | 51 | DKYFHARGNY DAARRGPGGA WAAKVISDAR | EAVQKFTGHG | AEDSradqfa |
| MAA3 (SEQ ID NO: 112) | 25 | DKYFHARGNY DAARRGPGGA WAAKVISDAR | EAVQKFTGHG | AEDS----- |
| MSAA3 (SEQ ID NO: 108) | 101 | newgrsgkdp nhfrpaglpk ry | ----- | -- |
| MAA3 (SEQ ID NO: 112) | | ----- | ----- | -- |

FIG. 11

| | | | | | |
|------------------------|-----|-----------------------|-------------|------------|------------|
| MSAA4 (SEQ ID NO: 109) | 1 | mrlatvivlc slflgvsdgi | WYSEFFREAVQ | GTWDLWRAYR | DNLEANYQNA |
| MAA4 (SEQ ID NO: 113) | 1 | ----- | WYSEFFREAVQ | GTWDLWRAYR | DNLEANYQNA |
| MSAA4 (SEQ ID NO: 109) | 51 | DQYFYARGNY EAQQRGSGGI | WAAKIISTSR | KYFQGLINRY | YFGIRNHGLE |
| MAA4 (SEQ ID NO: 113) | 31 | DQYFYARGNY EAQQRGSGGI | WAAKIISTSR | KYFQGLINRY | YFGIRNHGLE |
| MSAA4 (SEQ ID NO: 109) | 101 | TLqatqkaee wgrsgknph | frpeglpekf | | |
| MAA4 (SEQ ID NO: 113) | 81 | TL----- | ----- | | |

FIG. 12

| | | | |
|------|------------------|----|---|
| MAA1 | (SEQ ID NO: 110) | 1 | GFPSFVHEAF QGAGDMWRAY TDMKEANWKN SDKYFHARGN YDAQRGPGG |
| MAA2 | (SEQ ID NO: 111) | 1 | GFPSFIGEAF QGAGDMWRAY TDMKEAGWKD GDKYFHARGN YDAQRGPGG |
| MAA3 | (SEQ ID NO: 112) | 1 | -----EAG QGSRDMWRAY SDMKKANTWKN SDKYFHARGN YDAQRGPGG |
| MAA4 | (SEQ ID NO: 113) | 1 | -WYSEFFREAV QGTWDLWRAY RDNLEANTYQN ADQYFYARGN YEAQRGSGG |
| MAA1 | (SEQ ID NO: 110) | 51 | VWAEKISDG REAFQE----- -FFG---RGH EDT |
| MAA2 | (SEQ ID NO: 111) | 51 | VWAEKISDA RESFQE----- -FFG---RGH EDT |
| MAA3 | (SEQ ID NO: 112) | 44 | AWAAKVISDA REAVQK----- -FTG---HGA EDS |
| MAA4 | (SEQ ID NO: 113) | 50 | IWAAKIISTK RKYFQGLINr YFYGidHGL ETL |

FIG. 13

| | | | |
|------|------------------|----|---------|
| MAA1 | (SEQ ID NO: 110) | 69 | GRGHEDT |
| MAA2 | (SEQ ID NO: 111) | 69 | GRGHEDT |
| MAA3 | (SEQ ID NO: 112) | 62 | GHGAEDS |
| MAA4 | (SEQ ID NO: 113) | 76 | nhGLETL |

FIG. 14

| | | | | | | |
|------------------------|-----|------------|------------|------------|--------------------------|------------|
| HSAAL (SEQ ID NO: 98) | 1 | MKLLTGLVFC | SLVLGVSSRS | FFSFLGEAFD | GARDMWRAYS | DMREANYIGS |
| MSAAL (SEQ ID NO: 106) | 1 | MKLLTSLVFC | SLLLVCHGG | FFSFVHEAFQ | GAGDMWRAYT | DMKEANWKNS |
| HSAAL (SEQ ID NO: 98) | 51 | DKYFHARGNY | DAAKRGPGGV | WAAEAISDAR | enIQRF FF GHG | AEDSLADQAA |
| MSAAL (SEQ ID NO: 106) | 51 | DKYFHARGNY | DAAQRGPGGV | WAAEKISDGR | eafQE FF FGG | HEDTLADQEA |
| HSAAL (SEQ ID NO: 98) | 101 | NEWGRSGKDF | NHFRPAGLPE | KY | | |
| MSAAL (SEQ ID NO: 106) | 101 | NRHGRSGKDF | NYRPPGLPD | KY | | |

FIG. 15

| | | |
|-----------------------|----|--|
| HAAL (SEQ ID NO: 102) | 1 | KSFPSFLGEA FDGARDNWRA YSDMREANYI SSDKYFHARG NYDAAKRGPG |
| MAAL (SEQ ID NO: 110) | 1 | G-FFSFVHEA FQGAGDNWRA YTDKKEANWK HSDKYFHARG NYDAAQRGPG |
| HAAL (SEQ ID NO: 102) | 51 | GVWAAEAISD ARETIQRFFG HGAEDS |
| MAAL (SEQ ID NO: 110) | 50 | GVWAAEKISD GREAFQEFFG RGHEDT |

FIG. 16

| | | | |
|------|------------------|---|---------|
| HAA1 | (SEQ ID NO: 102) | 1 | CHCAEDS |
| MAA1 | (SEQ ID NO: 110) | 1 | GRGHEDT |

FIG. 17

| | | | |
|----------|------------------|-----|--|
| HSA1a1fa | (SEQ ID NO: 114) | 1 | mKLLTGLVFC SLVLGVSSRS FFSFLGEAFD GARDMWRAYS DMREANYIGS |
| HSA1a1be | (SEQ ID NO: 115) | 1 | mKLLTGLVFC SLVLGVSSRS FFSFLGEAFD GARDMWRAYS DMREANYIGS |
| HSA1a1ga | (SEQ ID NO: 116) | 1 | mKLLTGLVFC SLVLGVSSRS FFSFLGEAFD GARDMWRAYS DMREANYIGS |
| | | | |
| HSA1a1fa | (SEQ ID NO: 114) | 51 | DKYFHARGNY DAAKRGPGV WAAEAISDAR ENIQRFPGHD AEDSLADQAA |
| HSA1a1be | (SEQ ID NO: 115) | 51 | DKYFHARGNY DAAKRGPGV WAAEAISDAR ENIQRFPGHD AEDSLADQAA |
| HSA1a1ga | (SEQ ID NO: 116) | 51 | DKYFHARGNY DAAKRGPGV WAAEAISDAR ENIQRFPGHD AEDSLADQAA |
| | | | |
| HSA1a1fa | (SEQ ID NO: 114) | 101 | NEWGRSGKOP NHFRPAGLPE KY |
| HSA1a1be | (SEQ ID NO: 115) | 101 | NEWGRSGKOP NHFRPAGLPE KY |
| HSA1a1ga | (SEQ ID NO: 116) | 101 | NEWGRSGKOP NHFRPAGLPE KY |

FIG. 18

| | | | | | | | |
|-----------|------------------|-----|------------|------------|-------------|------------|------------|
| HSAA2alfa | (SEQ ID NO: 114) | 1 | mKLLTGLVFC | SLVLSVSSRS | FFSFLGEAFD | GARDMWRAYS | DmREANYIGS |
| HSAA2beta | (SEQ ID NO: 115) | 1 | mKLLTGLVFC | SLVLSVSSRS | FFSFLGEAFD | GARDMWRAYS | DmREANYIGS |
| HSAA2alfa | (SEQ ID NO: 114) | 51 | DKYFHARGNY | DAAKRGPGGA | WAAEVIISNAR | ENIQRLTGHG | AEDSLADQAA |
| HSAA2beta | (SEQ ID NO: 115) | 51 | DKYFHARGNY | DAAKRGPGGA | WAAEVIISNAR | ENIQRLTGRG | AEDSLADQAA |
| HSAA2alfa | (SEQ ID NO: 114) | 101 | NKNGRSGRDP | NHFRPAGLPE | KY | | |
| HSAA2beta | (SEQ ID NO: 115) | 101 | NKNGRSGRDP | NHFRPAGLPE | KY | | |

FIG. 19

| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 1 | 1 | abc | def | 0 | |
| kp1a (SEQ ID NO:123) | DIQMTQSPST | LSASVEDRVT | ITCRASQSI* | *****SSWLA | WYQOKPGKAP | KLLIYKASSL |
| kp1b (SEQ ID NO:124) |S |Q |D |NY |N |D |
| kp1c (SEQ ID NO:125) |S |G |G |RND |G |A |
| kp1d (SEQ ID NO:126) |S |G |G |NY |F |A |
| kp1e (SEQ ID NO:127) |S |G |G |A |D |D |
| kp1f (SEQ ID NO:128) | A..L.....S |V |G |G |A |A |
| kp1g (SEQ ID NO:129) |S |V |G |G |A |A |
| kp2a (SEQ ID NO:130) |T..LS | PVTP..EPAS | .S..S..LL | DSDDGNTY.D | ..L...OS | Q...TL.YR |
| kp2b (SEQ ID NO:131) |LS | PVTP..EPAS | .S..S..LL | HS.NGNTY.D | ..L...QS | Q...LG.NR |
| kp2c (SEQ ID NO:132) |T..LS | VTP..QPAS | .S.KS..LL | HS.DGNTY.Y | ..L...QP | Q...EV.NR |
| kp3a (SEQ ID NO:133) | E.V.....A | V.P.E.A | LS.....V |N |Q | R...G..TR |
| kp3b (SEQ ID NO:134) | E.VL...G | L.P.E.A | LS.....VS |Y |Q | R...G..R |
| kp3c (SEQ ID NO:135) | E.VL...A | L.P.E.A | LS.....VS |Y |Q | R...D..NR |
| kp4 (SEQ ID NO:136) | ..V.....DS | AV.L.E.A | .N.KS...VL | YSSNNKNY.. |QP |W..TR |
| kp5 (SEQ ID NO:137) | ETTL...AF | M..TP..K.N | .S.K..D.. |DDWN |E.A | IFI.QE.TI |

| | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|----------------------|------------|------------|----------|-------------|------------|
| | 5 | 5 ab | 3 | 3 | 3 |
| kp1a (SEQ ID NO:123) | ESGVPSRFSG | SG**SGTEFT | LTISLQPD | FATYCCQYN | SYS**** |
| kp1b (SEQ ID NO:124) |T |D |F |E |I |
| kp1c (SEQ ID NO:125) | Q.....Q |D |D |E |SY |
| kp1d (SEQ ID NO:126) | Q.....Q |D |D |E |L.H |
| kp1e (SEQ ID NO:127) | Q.....Q |D |D |E |P |
| kp1f (SEQ ID NO:128) | Q.....Q |D |D |E |F |
| kp1g (SEQ ID NO:129) | Q.....Q |D |D |E |N.P |
| kp2a (SEQ ID NO:130) | A...D... |D |D |E |A |
| kp2b (SEQ ID NO:131) | A...D... |D |D |E |M.RI |
| kp2c (SEQ ID NO:132) | F...D... |D |D |E |M.AL |
| kp3a (SEQ ID NO:133) | AT.I.A... |D |D |E |M.SI |
| kp3b (SEQ ID NO:134) | AT.I.D... |D |D |E |V |
| kp3c (SEQ ID NO:135) | AT.I.A... |D |D |E |R.E.E |
| kp4 (SEQ ID NO:136) |D... |D |D |E |V |
| kp5 (SEQ ID NO:137) | VP.I.P... |Y |D |NNIESE | A.Y.F.L.HD |

FIG. 21

| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----------------------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|
| lm1a (SEQ ID NO:138) | QSVLTQPPS* | VSAAPGQKVT | ISCSGSSNI | G***NNYVS | WYQQLPGTAP | KLLTYENKRR |
| lm1b (SEQ ID NO:139) | ... | A.GT... | R... | ... | ... | ... |
| lm1c (SEQ ID NO:140) | ... | V... | R... | ... | ... | ... |
| lm2a (SEQ ID NO:141) | ... | A... | SI... | ... | ... | ... |
| lm2b (SEQ ID NO:142) | ... | A... | R... | ... | ... | ... |
| lm3a (SEQ ID NO:143) | SY... | V... | KTAR | T.G.NNIG* | ... | ... |
| lm3b (SEQ ID NO:144) | SYE... | VS... | TAR | T...DALP* | ... | ... |
| lm3c (SEQ ID NO:145) | SYE... | VS... | TAS | T...DKLG* | ... | ... |
| lm4 (SEQ ID NO:146) | S.E... | D.A... | T.R | T.Q.D.LR* | ... | ... |
| lm6 (SEQ ID NO:147) | NFM... | H... | ES.KT... | ... | ... | ... |
| lm7 (SEQ ID NO:148) | T.V.E... | LTVS... | GT... | LT.AS.TGAV | TS...GY.PN | F.K.Q... |
| lm8 (SEQ ID NO:149) | L....S... | A..SL.AS.K | LT.TL.G** | ... | ... | ... |

| | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|----------------------|------------|------------|-----------|-----------|----------|
| lm1a (SEQ ID NO:138) | PSGIPDRFSG | SK**SGTSAT | LGITGLQTD | EADYVGTWD | SSLISA** |
| lm1b (SEQ ID NO:139) | ... | V... | ... | ... | ... |
| lm1c (SEQ ID NO:140) | ... | V... | ... | ... | ... |
| lm2a (SEQ ID NO:141) | ... | VSN | ... | ... | ... |
| lm2b (SEQ ID NO:142) | ... | V... | ... | ... | ... |
| lm3a (SEQ ID NO:143) | ... | E... | ... | ... | ... |
| lm3b (SEQ ID NO:144) | ... | E... | ... | ... | ... |
| lm3c (SEQ ID NO:145) | ... | E... | ... | ... | ... |
| lm4 (SEQ ID NO:146) | ... | ... | ... | ... | ... |
| lm6 (SEQ ID NO:147) | ... | V... | ... | ... | ... |
| lm7 (SEQ ID NO:148) | H.WT.A... | L.L.GK.A | TLS.V.PE. | ... | ... |
| lm8 (SEQ ID NO:149) | GD..... | S..... | AERY | T.SS..SE. |Q.G |

FIG. 22

| | | | | |
|------------|------------|------------|------------|----------------|
| 1 | 10 | 21 | 31 | 35 |
| NFLLTQPHS | VSESPGKTVT | ISCTRSSGSI | A***NNYVH | WYQORPGSSP |
| 45 | 55 | 65AB | 73 | 82 |
| TTVIFEDDHR | PSGVPDRFSG | SVDTSSNSAS | LTISGLKTED | EADYYCQSYD HNN |

V₆ W1 (SEQ ID NO: 150)

FIG. 23

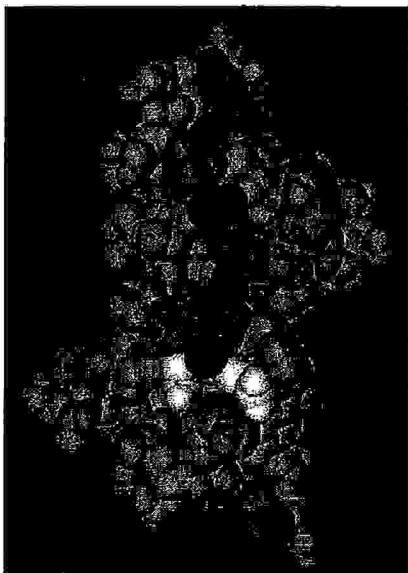
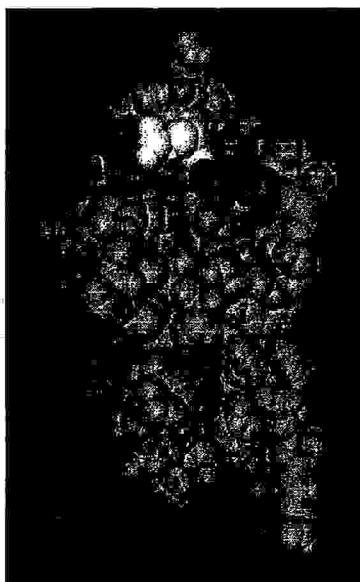
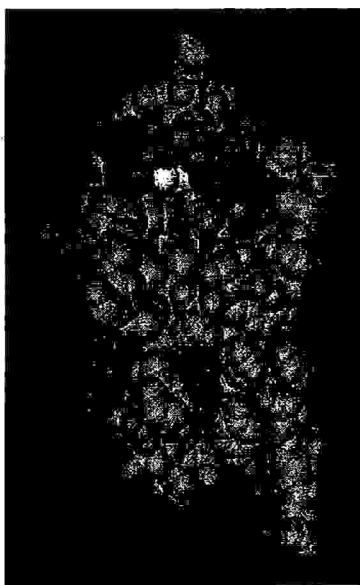


FIG. 24

25/40



V₆ Wil Glu81



V₆ Wil Asp82

FIG. 25

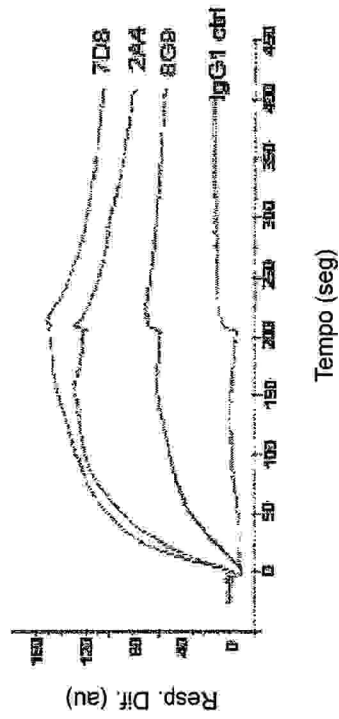


FIG. 26

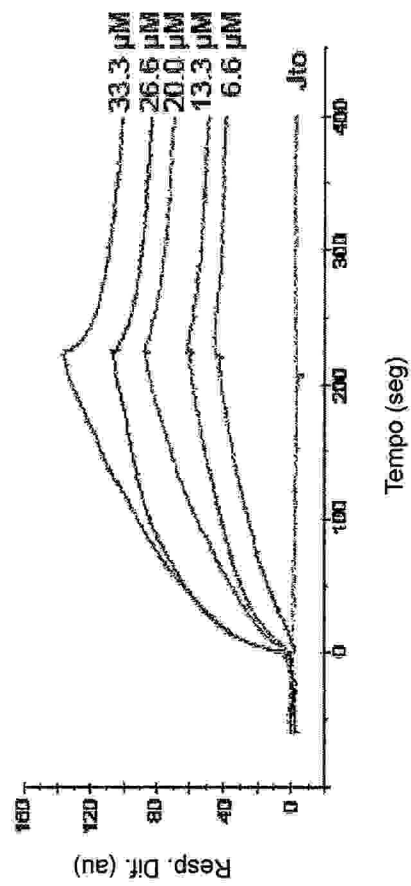


FIG. 27

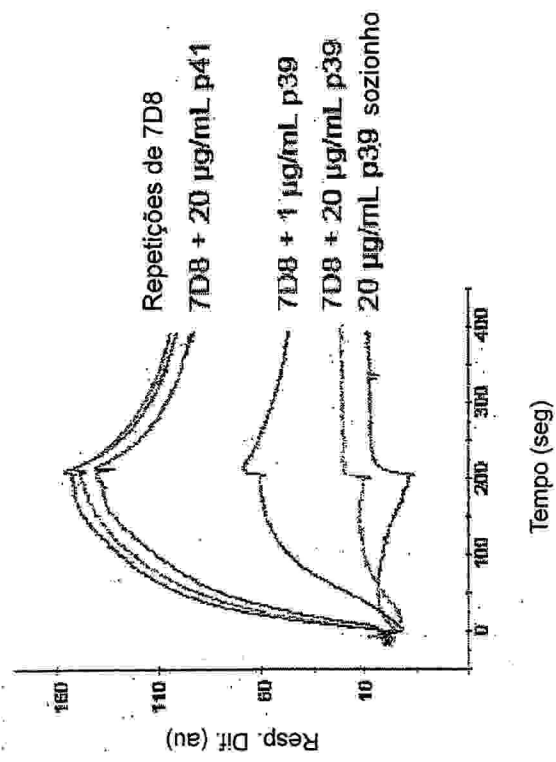


FIG. 28

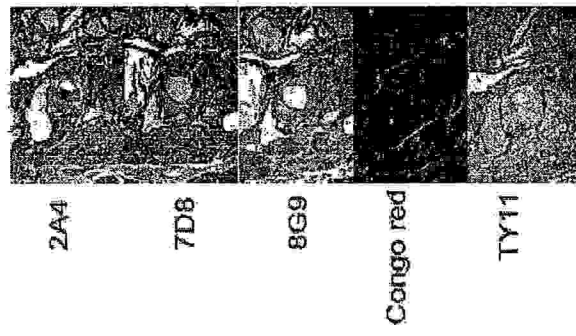


FIG. 29

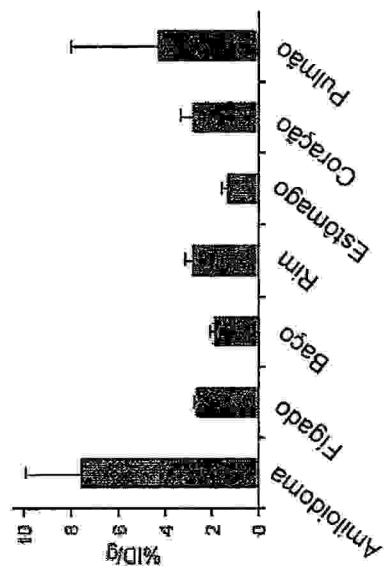


FIG. 30

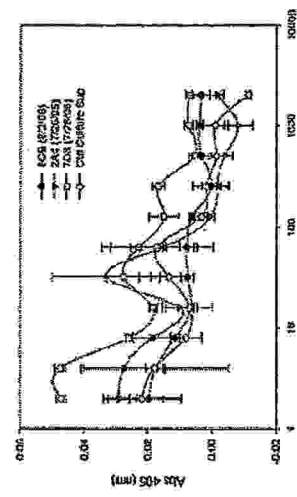
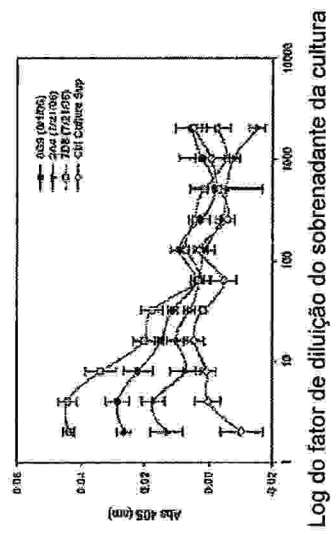


FIG. 31

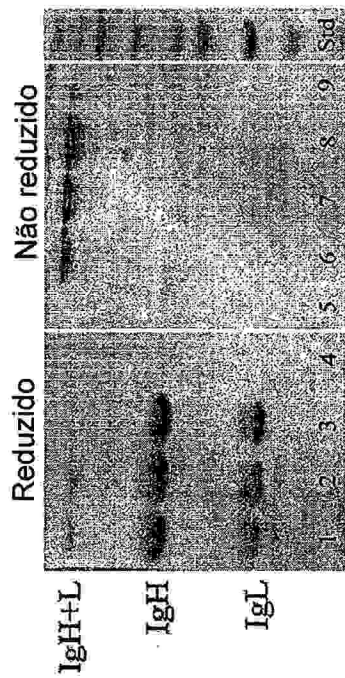


FIG. 32

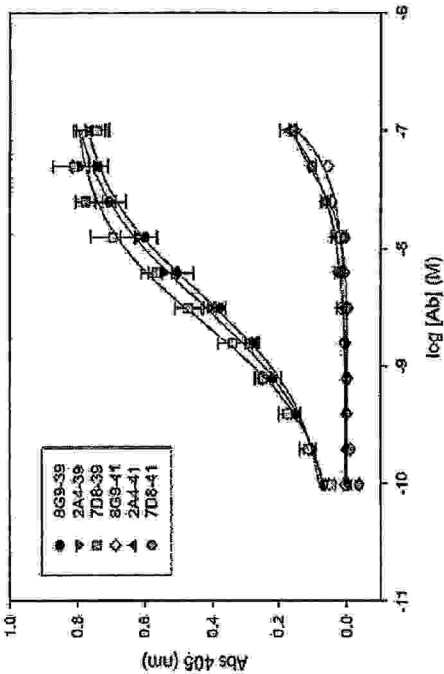


FIG. 33

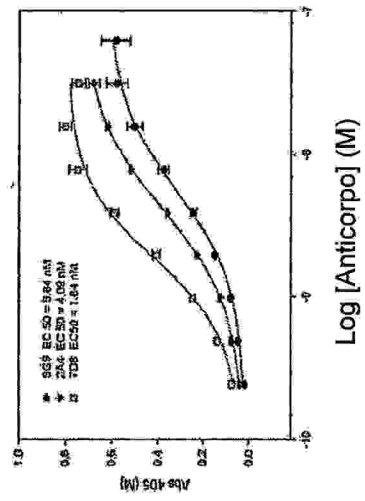


FIG. 34

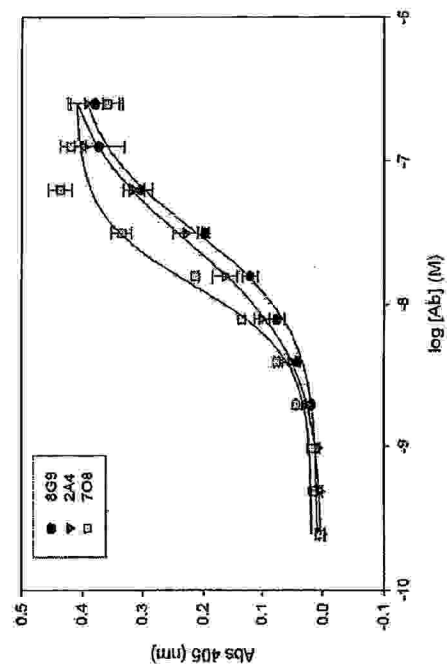


FIG. 35

VL Murina (2A4 e 8G9)
MKLPVRLLLVLMFWIPASSSDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSOSLVHSTGNTY^{LH}WYLQKPGQSPKLLIYK^{VSNR}FSGVPDRFSGS
 GSGTYFTLKISRVEAEDLGVYFC^{SQSTHVPFT}GGGTKLEIK (SEQ ID NO: 152)

VL Murina (7D8)
MKLPVRLLLVLMFWIPASSSDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSLSLVHSTGNTY^{LH}WYLQKPGQSPKLLIYK^{VSNR}FSGVPDRFSGS
 GSGTYFTLKISRVEAEDLGVYFC^{SQSTHVPFT}GGGTKLEIK (SEQ ID NO: 153)

VH Murina (2A4, 7D8, 8G9)
MVLGILKWVFFVVEYOGVHCEVQLVESGGRLVQPKGSLKLSCAASGFTENTYAMY^{WIRQ}APKGLEWVARIRSKSN^{NY}AIYYADSVK
DRFTIRDDSQSMLYLQMN^NLKTEDTAMYYCVRPYSD^{SFAY}WGQGITVSA (SEQ ID NO: 154)

FIG. 36A

VL de Hum2A4 Versão 1
DVVMTQSP~~LS~~LPVTPGEPASISCRSSQSLVHSTGNTY~~L~~HWY~~L~~QKPGQSPQLLIYK~~V~~SNRFSGV~~P~~DRFSGSGSGTyFTLKISRVEAEDVGV
YfCSQSTHVPFIFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 155)

VL de Hum2A4 Versão 2
DVVMTQSP~~LS~~LPVTPGEPASISCRSSQSLVHSTGNTY~~L~~HWY~~L~~QKPGQSPQLLIYK~~V~~SNRFSGV~~P~~DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
YfCSQSTHVPFTFGGKVEIK (SEQ ID NO: 156)

VL de Hum2A4 Versão 3
DVVMTQSP~~LS~~LPVTPGEPASISCRSSQSLVHSTGNTY~~L~~HWY~~L~~QKPGQSPQLLIYK~~V~~SNRFSGV~~P~~DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV
YYCSQSTHVPFTFGGKVEIK (SEQ ID NO: 157)

FIG. 36B

VL de Hum7D8 Versão 1
DVVMTQSPVLPVTPGEPASISCRSSLSLVHSTGNTYHLHWYLOKPGQSPQLLIYKVSNNRFGVDPDRFSGSGSGTYFTLKISRVEAEDVGV
YFCSQSTHVPFTFGGQTKLEIK (SEQ ID NO: 158)

VL de Hum7D8 Versão 2
DVVMTQSPVLPVTPGEPASISCRSSLSLVHSTGNTYHLHWYLOKPGQSPQLLIYKVSNNRFGVDPDRFSGSGSGTYFTLKISRVEAEDVGV
YFCSQSTHVPFTFGGQTKLEIK (SEQ ID NO: 159)

VL de Hum7D8 Versão 3
DVVMTQSPVLPVTPGEPASISCRSSLSLVHSTGNTYHLHWYLOKPGQSPQLLIYKVSNNRFGVDPDRFSGSGSGTYFTLKISRVEAEDVGV
YFCSQSTHVPFTFGGQTKLEIK (SEQ ID NO: 160)

VL de Hum7D8 Versão 4
DVVMTQSPVLPVTPGEPASISCRSSLSLVHSTGNTYHLHWYLOKPGQSPQLLIYKVSNNRFGVDPDRFSGSGSGTYFTLKISRVEAEDVGV
YFCSQSTHVPFTFGGQTKLEIK (SEQ ID NO: 174)

VL de Hum7D8 Versão 5
DVVMTQSPVLPVTPGEPASISCRSSLSLVHSTGNTYHLHWYLOKPGQSPQLLIYKVSNNRFGVDPDRFSGSGSGTYFTLKISRVEAEDVGV
YFCSQSTHVPFTFGGQTKLEIK (SEQ ID NO: 175)

VL de Hum7D8 Versão 6
DVVMTQSPVLPVTPGEPASISCRSSLSLVHSTGNTYHLHWYLOKPGQSPQLLIYKVSNNRFGVDPDRFSGSGSGTYFTLKISRVEAEDVGV
YFCSQSTHVPFTFGGQTKLEIK (SEQ ID NO: 176)

FIG. 36C

Região conservada de VL. No. de acesso no Gen Bank BAC01562

DVVMTQSPLSPLPVTGEPASISCRSSQSLHSGYNYLDWYLQKPGQPQLLYLGSNRASGVDPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGV
YYCMQALQTPLTFGGGKVEIKR (SEQ ID NO: 166)

Região conservada de VL. No. de acesso no Gen Bank BAC01733

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAADVVMTQSPLSPLPVTGEPASISCRSSQSLHSGYNYLDWYLQKPGQPQLLYLGSNRASGVDPDR
FSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPYTFGQGTKEIKRTV/AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECARQSTPFVCEYQGQSSDLPQPPVN
AGGGGGGGG (SEQ ID NO: 167)

FIG. 36D

VH de Hum2A4 / 7D8/ 8G9 Versão 1
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMYWIRQAPGKGLEWVaRIRSKSNNTYAIYYADSVKDRFTIHRDDSKNLSLYLQMNSL
KTEDIAVYYCvRPYSDSFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 161)

VH de Hum2A4 / 7D8/ 8G9 Versão 2
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMYWIRQAPGKGLEWVaRIRSKSNNTYAIYYADSVKDRFTISRDDSKNLSLYLQMNSL
KTEDIAVYYCvRPYSDSFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 162)

VH de Hum2A4 / 7D8/ 8G9 Versão 3
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMYWIRQAPGKGLEWVaRIRSKSNNTYAIYYADSVKDRFTISRDDSKNLSLYLQMNSL
KTEDIAVYYCvRPYSDSFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 163)

2A4_8G9_7D8_H_cadeia_pro (VH de 2A4 murino)
EVQLVESGGRLVQPKGSLKLSAASGFTFTNTYAMYWIRQAPGKGLEWVaRIRSKSNNTYAIYYADSVKDRFTIHRDDSQSNMILYLQMN
LKTEDTAMYYCvRPYSDSFAYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 164)

Região conservada de VH. de acesso no Gen Bank AAC51024
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMDWV/RQAPGKGLEWVGRTRNKANSYTTTEYAASVKGRFTISRDDSKNLSLYLQMN
SLKTEDTAVYYCARYVVGATLDYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 165)

FIG. 36E