

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

(22) Data de pedido: 2002.01.02	(73) Titular(es): WISTA LABORATORIES LTD.	
(30) Prioridade(s): 2001.01.03 GB 0100119	51 AYER RAJAH CRESCENT NO. 07-01/02	
(43) Data de publicação do pedido: 2003.10.01	SINGAPORE 139948	SG
(45) Data e BPI da concessão: 2012.03.07 114/2012	(72) Inventor(es): DAVID HORSLEY CLAUDE MICHEL WISCHIK JANET ELIZABETH RICKARD CHARLES ROBERT HARRINGTON FRANZ THEURING	GB GB GB GB DE
	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **MATERIAIS E MÉTODOS RELATIVOS A AGREGAÇÃO DE PROTEÍNAS EM DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS**

(57) Resumo:

RESUMO**"Materiais e métodos relativos a agregação de proteínas em doenças neurodegenerativas"**

São divulgados métodos de indução ou modelação do estado patológico de uma proteína de doença agregativa (ADP, p.ex. proteína tau) que esteja associada a um estado de doença no qual a ADP se agrega patologicamente (p.ex. doença de Alzheimer) através de uma interação de polimerização conformacional induzida, sendo o método caracterizado pelo passo de proporcionar uma proteína de fusão localizável na membrana compreendendo (i) uma porção de agregação, que é derivada da ADP ou de uma proteína que inicie a agregação patológica da ADP, (ii) uma porção de localização na membrana heteróloga. Crê-se que a localização na membrana da proteína de fusão baseada em ADP faz com que o local de captura de elevada afinidade da proteína ADP se torne exposto de modo a que seja promovida a agregação de mais ADP, que pode ser nativa ou heteróloga ao sistema. O método pode ser realizado *in vitro* ou em modelos celulares e animais, e pode ser utilizado para pesquisar moduladores do processo de agregação através da monitorização da agregação, p.ex. através da monitorização da produção de produtos de degradação relacionados com ADP resultantes da agregação. São também proporcionados materiais e processos para utilização com os métodos.

DESCRIÇÃO

"Materiais e métodos relativos a agregação de proteínas em doenças neurodegenerativas"

Campo técnico

O presente invento refere-se a modelos, materiais e métodos relativos à agregação de proteínas associadas a doença neurodegenerativa.

Arte antecedente

Condições de demência tais como a doença de Alzheimer (DA) são frequentemente caracterizadas por uma acumulação progressiva de depósitos intracelulares e/ou extracelulares de estruturas proteínáceas tais como placas -amilóides e emaranhados neurofibrilhares no cérebro dos pacientes afectados. O surgimento destas lesões correlaciona-se em grande parte com degeneração neurofibrilhar patológica e atrofia cerebral, bem como com incapacidade cognitiva (Mukaetova-Ladinska, EB et al. (2000) *Am. J. Pathol.* Vol. 157, No. 2, 623-636).

Tanto as placas neuríticas como os emaranhados neurofibrilhares contêm filamentos helicoidais emparelhados (PHF), dos quais um constituinte principal é a proteína tau associada aos microtúbulos (Wischik et al. (1988) *PNAS EUA* 85, 4506). As placas contêm também fibrilhas -amilóides extracelulares derivadas do processamento anormal da proteína precursora amilóide (APP; Kang et al. (1987) *Nature* 325, 733). Um artigo por Wischik et al. (em "Neurobiology of Alzheimer's Disease", 2ª Edição (2000) Eds. Dawbarn, D. e Allen, S.J., "The Molecular and Cellular Neurobiology Series", Bios Scientific Publishers, Oxford) discute em detalhe o papel putativo da proteína tau na patogénese de demências neurodegenerativas.

Os estudos da doença de Alzheimer indicam que a perda da forma normal de tau (Mukaetova-Ladinska et al. (1993) *Am. J. Pathol.*, 143: 565; Wischik et al. (1995a) *Neurobiol. Ageing*, 16: 409; Lai et al. (1995b) *Neurobiol. Ageing*, 16: 433),

acumulação de PHF patológicos (Mukaetova-Ladinska *et al.* (1993), *loc. cit.*; Harrington *et al.* (1994a) *Dementia*, 5, 215; Harrington *et al.* (1994b) *Am. J. Pathol.*, 145, 1472; Wischik *et al.*, (1995a), *loc. cit.*) e perda de sinapses no córtex médio-frontal (Terry *et al.* (1991) *Ann. Neurol.*, 30: 572) correlacionam-se com a incapacidade cognitiva associada. Além disso, a perda de sinapses (Terry *et al.*, *loc. cit.*) e a perda de células piramidais (Bondareff *et al.* (1993) *Arch. Gen. Psychiatry*, 50: 350) correlacionam-se ambas com medidas morfométricas de patologia neurofibrilhar reactiva com tau, que corresponde, a um nível molecular, a uma redistribuição quase total do banco de proteína tau de uma forma solúvel para uma polimerizada (PHF) na doença de Alzheimer (Mukaetova-Ladinska *et al.* (1993), *loc. cit.*; Lai *et al.* (1995), *loc. cit.*).

A tau existe em isoformas de processamento alternativo, que contêm três ou quatro cópias de uma sequência de repetição correspondente ao domínio de ligação aos microtúbulos (Goedert, M., *et al.* (1989) *EMBO J.* 8: 393-399; Goedert, M., *et al.* (1989) *Neuron* 3, 519-526). A tau em PHF é processada proteoliticamente num domínio nuclear (Wischik, C.M., *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4884-4888; Wischik *et al.* *PNAS USA* 1988, 85: 4506-4510); Novak, M., *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 365-370) que é constituído por uma versão com mudança de fase do domínio de repetição; apenas três repetições estão envolvidas na interacção estável tau-tau (Jakes, R., *et al.* (1991) *EMBO J.* 10: 2725-2729). Uma vez formados, agregados de tau semelhantes a PHF actuam como sementes para mais captura e proporcionam um molde para processamento proteolítico da proteína tau inteira (Wischik *et al.* 1996 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11213-11218).

No decurso da sua formação e acumulação, os filamentos helicoidais emparelhados (PHF) montam-se primeiro para formar agregados amorfos dentro do citoplasma, provavelmente a partir de oligómeros de tau iniciais que se tornam truncados antes, ou no decurso da, agregação de PHF (Mena, R., *et al.* (1995) *Acta Neuropathol.* 89: 50-56; Mena, R., *et al.* (1996) *Acta Neuropathol.* 91: 633-641). Estes filamentos vão, em seguida, formar emaranhados neurofibrilhares intracelulares clássicos. Neste estado, os PHF consistem num núcleo de tau

truncada e num revestimento exterior difuso contendo tau inteira (Wischik, C.M., et al. (1996b) em "Microtubule-associated proteins: modifications in disease", eds. Avila, J., Brandt, R. e Kosik, K. S. (Harwood Academic Publishers, Amsterdam) págs. 185-241)). O processo de montagem é exponencial, consumindo o banco celular de tau funcional normal e induzindo síntese de nova tau para compensar o défice (Lai, R.Y.K., et al., (1995), *Neurobiology of Ageing*, Vol. 16, No. 3, 433-445). Eventualmente, a incapacidade funcional do neurónio progride até ao ponto de morte celular, deixando para trás um emaranhado extracelular. A morte celular é altamente correlacionada com o número de emaranhados extracelulares (Wischik et al. 2000, *loc. cit.*). À medida que os emaranhados são extrudidos para o espaço extracelular, há uma perda progressiva do revestimento exterior difuso do neurónio com correspondente perda da imunorreactividade N-terminal da tau mas conservação da imunorreactividade da tau associada ao núcleo de PHF (Figura 4a; também Bondareff, W. et al., (1994) *J. Neuropath. Exper. Neurol.*, Vol. 53, No. 2, 158-164).

A mudança de fase que é observada no domínio de repetição da tau incorporada nos PHF sugere que o domínio de repetição sofre uma mudança conformacional induzida durante a incorporação no filamento. Durante o surgimento da doença de Alzheimer, considera-se que esta alteração conformacional pode ser iniciada através da ligação de tau a um substrato patológico, tal como proteínas membranares danificadas ou mutadas (ver Figura 19a - também Wischik, C.M., et al. (1997) em "Microtubule-associated proteins: modifications in disease", eds. Avila, J., Brandt, R. e Kosik, K. S. (Harwood Academic Publishers, Amsterdam) págs. 185-241).

No caso da doença de Alzheimer, as terapias farmacêuticas actuais estão centradas no tratamento sintomático da perda de transmissão colinérgica que resulta da neurodegeneração (Mayeux, R., et al. (1999) *New Eng. J. Med.* 341: 1670-1679). No entanto, embora os tratamentos disponíveis atrasem a progressão da doença durante até seis a oito meses, não a previnem. A descoberta de fármacos que possam prevenir a agregação de tau que conduz a neurodegeneração proporcionaria uma estratégia mais eficaz

para profilaxia ou para inibição da progressão da doença, o que não requereria um conhecimento imediato dos diversos eventos a montante que iniciam a agregação (Figura 19b).

Ensaaios da agregação de proteínas

Com base no modelo putativo descrito acima, WO 96/30766 descreve um ensaio *in vitro* para a agregação de tau no qual um fragmento de tau correspondendo ao domínio de repetição nuclear, que foi adsorvido a um substrato de fase sólida, é capaz de capturar tau inteira solúvel e se liga a tau com elevada afinidade. Esta associação confere estabilidade contra a digestão proteolítica das moléculas de tau agregadas. O processo é auto-propagado, e pode ser bloqueado selectivamente através de agentes farmacêuticos protótipo (Wischnik, C.M., *et al.* (1996), *loc. cit.*).

Embora o ensaio *in vitro* descrito em WO 96/30766 permita a identificação de inibidores ou moduladores da associação tau-tau, os presentes inventores reconheceram também que seriam úteis modelos baseados em células de agregação de proteínas semelhantes à doença de Alzheimer. Tais modelos celulares poderiam ser utilizados tanto na pesquisa primária de moduladores candidatos da agregação tau-tau, e na pesquisa secundária de compostos já identificados no ensaio *in vitro* de WO 96/30766. Além disso, a demonstração da agregação de tau em células pode também ajudar na identificação de substratos celulares normais, que estejam envolvidos na iniciação da agregação patológica de tau, substratos que poderiam eles mesmos ser alvos de intervenção farmacêutica.

No entanto, numerosos artigos relatando a expressão de várias construções de tau em modelos de cultura de tecidos não conseguiram demonstrar agregação (ver, p.ex., Baum, L. *et al.*, (1995) *Mol. Brain Res.* 34: 1-17).

Estes problemas podem ser entendidos quando se considera que a agregação de tau solúvel *in vitro* tem até agora sido alcançada apenas sob condições não fisiológicas e a concentrações elevadas (revisto em Wischnik (2000), *loc. cit.*).

WO 96/30766 também descreve duas abordagens para o estudo da agregação de tau num ambiente celular. Na primeira abordagem, a tau inteira ou fragmentos de tau foram estavelmente expressos em células. Na segunda abordagem, a tau agregada foi transientemente transfectada para células através da utilização de lipofectina.

Embora ambas estas abordagens sejam úteis para o estudo da agregação tau-tau, têm algumas limitações. A transfecção de tau agregada para células utilizando lipofecção é de eficiência variável, tal como é a produção da própria tau agregada. Além disso, verifica-se que o fragmento de tau nuclear, que é a semente mais eficiente para a agregação de tau, é tóxico quando estavelmente expresso nas células, conduzindo a baixos níveis de expressão. Assim, a expressão constitutiva do fragmento de tau truncada do núcleo de PHF em células eucarióticas é difícil de alcançar. Os sistemas de expressão transiente permitem a optimização da expressão de tau, mas a toxicidade inerente dos fragmentos torna até estes sistemas não fiáveis. Os fragmentos mais longos de tau são menos tóxicos, mas estes não se agregam de forma fiável quando expressos nas células.

Assim, seria desejável desenvolver um sistema modelo alternativo, em que a interacção entre p.ex. moléculas de tau e semelhantes pudesse ser investigada sob condições fisiológicas, numa linha celular estável e controlável, e que poderia ser utilizado para pesquisar potenciais agentes de diagnóstico, prognóstico ou terapêuticos de condições tais como a doença de Alzheimer.

Modelos animais

Embora os ensaios *in vitro* e baseados em células possam ser ferramentas úteis, modelos animais da doença de Alzheimer e de condições relacionadas podem ajudar a compreender a relação entre as alterações bioquímicas e patológicas no cérebro e as perturbações da memória e do comportamento. Além disso, permitem que a patogénese do processo de doença seja examinada *in vivo* e proporcionam um modelo no qual podem ser testadas estratégias terapêuticas.

Especificamente, os modelos animais colocam os sistemas baseados em células num contexto farmacocinético onde, por exemplo, potenciais agentes terapêuticos podem ser avaliados não apenas em termos de determinadas actividades bioquímicas contra agregação de proteínas, mas também em termos de toxicidade, distribuição e semivida no local de acção, p.ex. através da barreira hematoencefálica.

Não obstante, os modelos existentes não conseguem apresentar a combinação de emaranhados, placas e incapacidade cognitiva característicos de DA. Cães e primatas não humanos idosos desenvolvem -amiloidose, mas a patologia de tau não é uma característica nestes animais (Walker, 1997). Semelhantemente, foram criados ratinhos transgénicos modelando amiloidose, mas estes não conseguem apresentar deposição anormal de tau (Janus, Chishti, & Westaway, 2000). Inversamente, os modelos animais da patologia de tau não conseguem demonstrar patologia amilóide. Os emaranhados que se acumulam no cérebro de roedores tratados com alumínio diferem na sua ultra-estrutura dos verificados em DA (ver acima). Alterações dos filamentos citosqueléticos associadas a tau fosforilada de forma anormal têm sido observadas em babuínos, ursos, ovinos e caprinos idosos (Braak, Braak, & Strothjohann, 1994; Cork et al., 1988; Nelson, Greenberg, & Saper, 1994; Nelson & Saper, 1995; Roertgen et al., 1996; Schultz et al., 2000).

Algumas experiências implicaram ligações entre tau e amilóide em modelos animais. A tau hiperfosforilada acumula-se no compartimento somatodendrítico de neurónios nos cérebros de ratos após a infusão intraventricular crónica de ácido ocadaico, um inibidor da proteína-fosfatase 2A (Arendt, Holzer, Fruth, Brijckner, & Gartner, 1995). Além disso, o tratamento com ácido ocadaico levou também à formação de depósitos extracelulares de A e perda da memória. Dois outros estudos implicaram A na acumulação de tau em modelos animais. Microinjecções de A fibrillar no córtex de macacos rhesus idosos causaram as acumulações focais de tau fosforilada intracelular (Geula et al., 1998). Isto foi dependente tanto da idade como da espécie; o mesmo resultado não foi observado para ratos ou macacos rhesus jovens. Em segundo lugar, os depósitos focais de tau foram observados em

ratinhos que eram transgênicos para APP possuindo mutações associadas a DA (Sturchler-Pierrat *et al.*, 1997).

Os cérebros de ratinhos deficientes em tau parecem imuno-histoquimicamente normais e o alongamento axonal não foi afectado em neurónios em cultura (Harada *et al.*, 1994). No entanto, a estabilidade dos microtúbulos foi diminuída e a sua organização alterada nalguns axónios de pequeno calibre. Além disso, foi verificado um aumento na proteína associada a microtúbulos 1A (MAP 1A), que poderia compensar uma perda funcional de tau em axónios de grande calibre. Assim, a tau parece ser crucial na estabilização e organização dos microtúbulos dos axónios em certos axónios. Estudos subsequentes demonstraram que ratinhos deficientes em tau exibem sinais semelhantes a certos sintomas característicos de pacientes de demência frontotemporal, i.e. alterações de personalidade (desinibição/agressão) e deterioração da memória e função executiva. Os ratinhos mostraram fraqueza muscular e deficiente controlo do equilíbrio, hiperactividade num novo ambiente, e deficiência no condicionamento de medo contextual (Ikegami, Harada, & Hirokawa, 2000). As tarefas de aprendizagem espacial, no entanto, não foram afectadas nos ratinhos como é a função de memória em pacientes de FTDP-17.

Apesar dos emaranhados neurofibrihaires e das alterações fenotípicas não terem sido relatados em animais transgênicos para as isoformas de tau de 3 ou 4 repetições (Brion, Tremp, e Octave, 1999; Gotz *et al.*, 1995), estas descobertas podem reflectir baixos níveis de expressão proteica.

Deficiente função motora, na presença ou ausência de tauopatia, tem sido observada em ratinhos expressando níveis mais elevados da proteína tau humana (Ishihara *et al.*, 1999; Spittaels *et al.*, 1999). Nesses animais, as inclusões filamentosas não exibem as características ultra-estruturais dos PHF de DA.

Um modelo de ratinho transgénico recente expressando tau humana com a mutação P301L desenvolve emaranhados neurofibrilhares, perda neuronal e disfunção motora (Lewis *et al.*, 2000). As inclusões de tau nestes ratinhos mostram filamentos em fita tanto direitos como torcidos semelhantes

aos verificados em pacientes humanos. Tentativas de combinar este modelo com amiloidose estão em andamento através do cruzamento destes ratinhos com os transgênicos para APP. Outros modelos de ratinhos transgênicos são discutidos nas patentes US 5912410 e 5898094.

Assim, pode observar-se que os modelos animais existentes não conseguem demonstrar qualquer prova patológica de que o transgene conduza à acumulação de proteína tau truncada englobando o domínio de PHF. Embora sejam observados filamentos em tau possuindo a mutação P301L, isto corresponde a uma forma de tau que causa FTDP-17 e não DA. Até à data, não foi identificada qualquer mutação no gene de tau que cause AD e, portanto, as abordagens baseadas meramente na proteína mutada para o efeito podem ser de importância limitada.

Mais particularmente, não houve qualquer divulgação clara de tau não mutada agregando-se nestes modelos, tal como evidenciado através do processamento proteolítico num fragmento nuclear truncado correspondente ao verificado de facto no núcleo de PHF de DA. Um sistema em que tal processamento proteolítico ocorresse num contexto farmacocinético proporcionaria assim um contributo para a técnica.

Descrição da invenção

Tal como discutido acima, uma alteração conformacional de tau, em vez de uma modificação química, é responsável pela agregação progressiva de moléculas de tau e sua subsequente polimerização para formar PHF.

Surpreendentemente, os presentes inventores verificaram agora que é possível reproduzir esta alteração conformacional num sistema modelo, causando a síntese de uma forma localizada na membrana da proteína de interesse, p.ex., tau, ou seus fragmentos contendo o domínio de agregação nuclear.

Verificou-se, inesperadamente, que a associação de p.ex. tau ou fragmentos de tau a uma membrana celular ou de organelo, p.ex. a membrana plasmática de uma célula ou a

membrana do retículo endoplasmático, pode também semear a agregação de moléculas adicionais de tau ou fragmentos de tau, propagando assim a formação de agregados tau-tau de um modo de alguma forma análogo ao observado no sistema de ensaio de fase sólida de WO 96/30766. Esta técnica parece ter uma ampla aplicabilidade para proteínas envolvidas em doenças do tipo de agregação de proteínas.

Embora não desejando estar limitado a qualquer mecanismo particular, é proposto pelos inventores que a síntese localizada na membrana de proteínas faz com que o local de captura de alta afinidade desta proteína fique exposto, através da indução física da alteração conformacional da proteína tau que ocorre após a sua ligação a um substrato apropriado. O efeito desta alteração conformacional pode ser o de criar uma concentração local suficientemente elevada de tau na sua conformação de sementeira para que seja promovida mais agregação da proteína. Estas observações podem ter implicações para todas as doenças em que a agregação da proteína desempenhe um papel.

Em vários aspectos, a presente invenção proporciona métodos de modelação de agregação intracelular de uma proteína apropriada, ou um fragmento nuclear seu, semelhante a doença, o método caracterizando-se pelo passo de síntese de uma forma localizada na membrana de uma proteína que pode iniciar tal agregação. Tais métodos podem ser utilizados, por exemplo, para identificar moduladores da agregação. Os métodos são realizados *in vitro*, ou numa célula ou linha celular em cultura, ou em animais não-humanos.

Assim, em aspectos do invento são proporcionados polipéptidos de fusão compreendendo: (i) uma porção de agregação, que é derivada de uma proteína associada a uma doença na qual a proteína se agrega ou inicia a agregação de proteína através de uma interacção de polimerização conformacional induzida, (ii) uma porção heteróloga localizada na membrana.

Deste modo, uma proteína tal como tau, ou um fragmento nuclear de tau, ou uma proteína correspondente tal como discutido abaixo, pode ser sintetizada na forma de uma

proteína localizada na membrana, onde pode actuar como semente para a agregação intracelular e o processamento proteolítico da fusão a um nível apropriado para modelação da agregação da proteína real a partir da qual foi derivada. Pode também semear a agregação com ou entre outras moléculas (p.ex. moléculas de tau inteiras), propagando assim a formação de agregados de proteínas.

As células que expressam tais agregados de proteínas associados à membrana podem ser utilizadas como modelos de agregação de proteínas relacionada com doença, tal como a observada nas células de doenças semelhantes a Alzheimer *in vivo*. Este sistema modelo pode ser utilizado em estudos posteriores, tais como em ensaios de pesquisa de potenciais agentes terapêuticos, de prognóstico ou diagnóstico, tal como descrito em detalhe abaixo.

Assim, num aspecto do presente invento é divulgado um método de indução, modelação ou controlo da agregação de uma proteína associada a uma doença em que a proteína sofre uma interacção conformacional induzida, o método compreendendo os passos de: (a) introdução numa membrana, de um polipéptido de fusão compreendendo: (i) uma porção de agregação, que é derivada de uma primeira proteína associada a uma doença em que a proteína sofre uma interacção de polimerização conformacional induzida, (ii) uma porção heteróloga localizada na membrana, (b) causar ou permitir uma interacção de polimerização conformacional induzida entre o polipéptido de fusão e um outro polipéptido, tal como causar a agregação do referido outro polipéptido. Opcionalmente, a extensão da agregação pode ser monitorizada.

Nesta e noutras concretizações, o outro polipéptido pode, por exemplo, ser uma outra proteína de fusão, ou pode resultar de degradação proteolítica do polipéptido de fusão, tais como para produzir uma segunda proteína capaz de sofrer uma interacção de polimerização conformacional induzida com a referida primeira proteína.

É também aqui divulgado um método de indução, modelação ou controlo da agregação de uma (segunda) proteína associada

a uma doença em que a proteína sofre uma interacção conformacional induzida, o método compreendendo os passos de:

(a) introdução numa membrana de um polipéptido de fusão compreendendo: (i) uma porção de agregação, que é derivada de uma primeira proteína associada a uma doença em que a proteína sofre ou inicia uma interacção de polimerização conformacional induzida, (ii) uma porção heteróloga de localização na membrana,

(b) colocar em contacto o polipéptido de fusão com uma segunda proteína capaz de sofrer uma interacção de polimerização conformacional induzida com a referida primeira proteína, pelo que a interacção da segunda proteína com a proteína de fusão localizada na membrana causa a agregação da segunda proteína. Opcionalmente, a extensão da agregação pode ser monitorizada.

São divulgados abaixo exemplos da primeira e segunda proteínas, que podem ser derivadas da mesma ou de diferentes proteínas associadas a uma doença. Em particular, a primeira proteína será uma que (em resultado de uma mudança conformacional induzida) inicia e/ou participa na agregação de outra proteína que é a mesma ou diferente, e a segunda será uma que de facto se agrega na doença relevante.

Em concretizações preferidas são divulgados métodos baseados em células de indução de agregação intracelular de uma proteína associada a uma doença em que a proteína sofre uma interacção conformacional induzida, p.ex. compreendendo os passos de: (a) introduzir numa célula, de modo a que fique localizado numa membrana na célula, um polipéptido de fusão compreendendo: (i) uma porção de agregação, que é derivada de uma primeira proteína associada a uma doença em que a proteína sofre uma interacção de polimerização conformacional induzida, (ii) uma porção heteróloga de localização na membrana, (b) introduzir numa célula, uma segunda proteína capaz de sofrer uma interacção de polimerização conformacional induzida com a referida primeira proteína, pelo que a interacção da segunda proteína com a proteína de fusão localizada causa agregação intracelular e opcionalmente processamento proteolítico de cada uma.

Novamente, opcionalmente a extensão de agregação e/ou processamento proteolítico da segunda proteína pode ser monitorizada. Isto pode ser na presença de um ou mais agentes suspeitos de serem capazes de modular (p.ex. inibindo ou invertendo) a agregação.

Geralmente falando, o método será realizado através da utilização de um ácido nucleico codificando a proteína de fusão e/ou a segunda proteína.

Alguns aspectos e concretizações preferidos do presente invento serão agora descritos em maior detalhe.

Doenças e proteínas

Tal como acima referido, o invento pode empregar qualquer proteína que esteja associada a uma doença em que a proteína sofre uma interacção de polimerização conformacional induzida i.e. uma em que uma alteração conformacional da proteína semeia a ligação e agregação de mais moléculas proteicas de um modo auto-propagado. Uma vez iniciada a nucleação, pode resultar uma cascata de agregação que envolve a polimerização conformacional induzida de mais moléculas proteicas, cuja alteração conformacional pode tornar os agregados mais resistentes a mais proteólise. Pensa-se que os agregados de proteínas assim formados sejam a causa próxima de neurodegeneração, demência clínica e outros sintomas patológicos deste grupo de doenças. Meramente por questões de brevidade, este grupo de condições pode ser aqui referido como condições "semelhantes a doença de Alzheimer".

As concretizações preferidas do invento são baseadas na proteína tau. Quando aqui utilizado, o termo "proteína tau" refere-se geralmente a qualquer proteína da família das proteínas tau. As proteínas tau são caracterizadas como sendo uma entre um número maior de famílias de proteínas que co-purificam com microtúbulos durante ciclos repetidos de montagem e desmontagem (Shelanski et al. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 70: 765-768), e são conhecidas como proteínas associadas a microtúbulos (MAP). Os membros da família tau partilham as características comuns de possuir um segmento N-terminal característico, sequências de aproximadamente 50

aminoácidos inseridos no segmento N-terminal, que são reguladas durante o desenvolvimento no cérebro, uma região de repetições em cadeia característica consistindo em 3 ou 4 repetições em cadeia de 31-32 aminoácidos, e uma cauda C-terminal. O termo é assim exemplificado por, mas não se limita a, moléculas tau que formam PHF (e, finalmente, emaranhados neurofibrilares) em cérebros de doença de Alzheimer. De facto, os PHF acumulam-se no compartimento somatodendrítico, onde a proteína associada a microtúbulos predominante é MAP2 (Matus, A., em "Microtubules" [Hyams e Lloyd, eds.] págs. 155-166, John Wiley e Sons, NY). As isoformas de MAP2 são quase idênticas à proteína tau na região de repetições em cadeia, mas diferem substancialmente tanto na sequência como na extensão do domínio N-terminal (Figuras 7 e 8; Kindler e Garner (1994) *Mol. Brain Res.* 26, 218-224). No entanto, a agregação na região de repetições em cadeia não é selectiva para a sequência de aminoácidos nuclear de tau específica. Assim, será apreciado que qualquer discussão aqui em relação à agregação tau-tau deve ser tida como relativa também à agregação tau-MAP2 e à agregação MAP2-MAP2.

A Figura 20 mostra uma Tabela listando várias outras proteínas de agregação associadas a doença que podem ser utilizadas no presente invento. Em cada caso é também listada a doença ou doenças em que a iniciação da agregação e/ou mutação da proteína ou proteínas podem ter um papel. O domínio ou mutação responsável pela actividade da doença é listado, e pelo menos toda ou parte desta porção mínima da proteína seria de preferência englobada pela proteína utilizada no invento como a proteína de "captura" ou "sementeira" direccionada à membrana.

Tal como se pode observar a partir da tabela, doenças exemplares que são caracterizadas por agregação de proteínas patológica incluem a doença dos neurónios motores e a doença de corpos de Lewy. Além disso, a patogénese de doenças neurodegenerativas tais como a doença de Pick e a Paralisia Supranuclear Progressiva parece correlacionar-se com uma acumulação patológica de agregados de tau truncada no giro dentado e nas células piramidais estreladas do neocórtex, respectivamente (Wischik et al. 2000, *loc. cit.*).

A Figura 21 descreve proteínas que podem estar envolvidas nos estádios de iniciação de doenças do tipo discutido aqui. Por exemplo, em Wischik, C.M., et al. (1997) [supra] é discutida uma variedade de proteínas membranares que podem estar envolvidas na iniciação de captura de tau e precursor da proteína amilóide em DA. Estas incluem presenilinas e proteínas mitocondriais tais como a proteína nuclear 2 do complexo enzimático bc₁ (CP2), subunidade 9 da ATP-sintetase (ATP S-9) e porina.

Assim será apreciado que, à luz da discussão acima (e excepto quando o contexto exija de outra forma), quando as concretizações do invento são descritas em relação à proteína tau ou proteínas semelhantes a tau (p.ex. MAP2), a descrição deve ser tomada como aplicando-se igualmente às outras proteínas discutidas acima (p.ex. -amilóide, sinucleína, prião, proteína mitocondrial apropriada, etc.) ou outras proteínas que podem sofrer uma agregação patológica semelhante em virtude de alteração conformacional num domínio crítico para propagação da agregação, ou que confere estabilidade proteolítica ao agregado assim formado (artigo por Wischik et al. (Em "Neurobiology of Alzheimer"s Disease", 2ª Edição (2000) Eds. Dawbarn, D. e Allen, S.J., "The Molecular and Cellular Neurobiology Series", Bios Scientific Publishers, Oxford). Todas essas proteínas podem ser aqui referidas como "proteínas de doença de agregação".

De igual modo, quando é feita aqui menção da "agregação tau-tau", ou semelhante, esta pode também ser tomada como sendo aplicável a outra "agregação de proteína de agregação", tal como agregação de -amilóide, agregação de prião e agregação de sinucleína, etc. De igual modo a "degradação proteolítica de tau" e assim por diante.

As proteínas para utilizar nos métodos descritos acima podem, quando apropriado (p.ex. no estudo da ligação tau-tau) ser isoladas a partir de tecidos cerebrais através de métodos conhecidos dos peritos na arte, por exemplo tal como descrito nas respectivas referências. A tau solúvel pode ser isolada quer a partir de tecidos cerebrais humanos quer a partir de tecidos cerebrais animais, com um atraso *post-mortem* de menos

de 24 horas (ver Wischik *et al.* (1988); (1995a), *loc. cit.*). As proteínas dos microtúbulos podem ser obtidas através de três ciclos de montagem-desmontagem dependente da temperatura de acordo com Shelanski *et al.* (1973, *loc. cit.*). A lipofecção das proteínas pode ser efectuada de forma análoga aos métodos descritos em W096/30766. De preferência a produção de p.ex. proteínas tau e fragmentos destas, será conseguida através de tecnologia de ADN recombinante convencional, tal como descrito abaixo.

Fragmentos, derivados e controlos

Não existe qualquer requisito de que o invento empregue a proteína inteira; de facto isto pode ser indesejável em certos contextos. Igualmente, a proteína utilizada pode incluir um terminal N ou C prolongado.

Tal como mostrado nos Exemplos a seguir, a natureza da porção de agregação da fusão pode ser tal que os níveis apropriados de agregação (e possível processamento proteolítico) são alcançados mesmo na ausência de mais moléculas.

Alternativamente ou adicionalmente, podem ser proporcionadas mais moléculas (p.ex. moléculas inteiras de proteínas de doença) que participam na agregação.

Em concretizações preferidas do presente invento, o polipéptido de fusão, tal como sintetizado tanto no método baseado em células como no método *in vitro* aqui descrito, compreende ou consiste essencialmente num fragmento truncado. Um tal fragmento será geralmente um "fragmento nuclear", termo que se refere à parte da proteína que é capaz de se ligar a outra proteína para iniciar ou propagar a agregação. No caso de proteínas de doença que se agregam, é também provável que tais fragmentos nucleares sejam os que contribuem para a estabilidade proteolítica do agregado.

Assim, por exemplo, um "fragmento nuclear de tau" é um fragmento de tau compreendendo uma sequência da proteína tau truncada derivada da região de repetições em cadeia ("domínio de repetição em cadeia nuclear") e que, nas condições

apropriadas, é capaz de se ligar à região de repetições em cadeia de uma proteína tau adicional ou a uma proteína MAP2 com elevada afinidade.

Quando o polipéptido de fusão é derivado de tau, o fragmento truncado pode compreender de preferência um fragmento de cerca de 186-296 prolongando-se até cerca de 390-441 da proteína inteira, ainda de preferência qualquer uma das seguintes porções: 186 a 390 ou 391 ou 441; 296 a 390 ou 391 ou 441 (ver Figuras 5 e 10). Nos Exemplos a seguir, a ligação do fragmento de tau à sequência sinal destruiu os aminoácidos 186-189, de modo que o aminoácido de início foi equivalente ao 190.

No caso de APP (proteína precursora amilóide), por exemplo, pode ser preferida a expressão de um fragmento da APP que englobe o domínio A de 1-40 ou 1-42 aminoácidos como uma proteína de fusão.

Outros fragmentos nucleares podem ser baseados p.ex. nos domínios discutidos com referência às Figuras 20 e 21.

O comprimento total do polipéptido de fusão pode ser qualquer um que seja apropriado para o ensaio e fragmento nuclear da proteína de doença de agregação a utilizar, mas terá geralmente mais de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 ou 500 aminoácidos de comprimento.

Em todos os casos aqui, quando é discutida uma designada proteína (p.ex. fragmento nuclear) ou uma sequência de ácido nucleico citada, um derivado ou outra variante da correspondente proteína de referência (ou ácido nucleico) pode ser utilizado conforme apropriado, desde que mantenha as características apropriadas da sequência de referência. Tais derivados partilharão também a identidade de sequência com a sequência de referência.

Em princípio, um derivado pode ser um derivado químico que pode ser preparado a partir dos grupos funcionais que ocorrem como cadeias laterais nos resíduos ou os grupos NB ou C-terminais, através de meios conhecidos na arte. Estes derivados podem incluir ésteres alifáticos dos grupos

carboxilo, amidas dos grupos carboxilo através de reacção com amónia ou com aminas primárias ou secundárias, derivados N-acilo de grupos amino livres dos resíduos de aminoácidos formados com porções acilo (p.ex. grupos alcanoilo ou aroilo carbocíclico) ou derivados O-acilo de grupos hidroxilo livres (por exemplo, os de resíduos serilo ou treonilo) formados com porções acilo.

Mais vulgarmente o derivado será um através de inserção, deleção ou adição de aminoácidos da sequência de referência. Por exemplo, um derivado de uma proteína tau, ou fragmento nuclear de tau, compreenderá pelo menos uma sequência de aminoácidos parcial semelhante à região de repetição em cadeia das proteínas tau, mas em que um ou mais dos aminoácidos da tau natural ou dos seus fragmentos foram substituídos ou suprimidos, ou na qual foram inseridos outros aminoácidos.

Tais alterações podem ser feitas para melhorar ou suprimir a actividade de ligação (sendo o último caso útil para experiências de controlo). Os controlos podem conter deleções de sequências ou domínios para verificar o efeito na agregação que estas possam ter.

Derivados preferidos podem ser os que incorporam mutações correspondentes às conhecidas ou que se suspeita estarem associadas ao estado de doença. Estes podem incluir alterações correspondentes a P301S dentro da sequência de tau (ver Fig. 5). Outras mutações incluem G272V, G389R, P301L, N279K, S305N, V337M, G272V, K280, R406W (ver também Wischik *et al.*, 2000, *supra*).

Outros derivados preferidos podem incluir repetições em cadeia dos fragmentos nucleares discutidos acima, ou domínios de ligação dentro desses fragmentos.

Ainda outros derivados podem ser baseados em produtos quiméricos com base em múltiplas proteínas de doença relacionadas nas quais as suas sequências são misturadas ou combinadas. Por exemplo fragmentos de enzimas de restrição de tau podem ser ligados com fragmentos de MAP2 ou mesmo de um gene não relacionado para gerar derivados recombinantes. Uma

estratégia alternativa para modificação de fragmentos nucleares empregaria PCR tal como descrito por Ho et al., 1989, *Gene* 77: 51-59, ou baralhamento de ADN (Crameri et al., 1998, *Nature* 391).

Sequência de localização membranar

A porção heteróloga de localização ou direccionadora para a membrana da fusão pode ser qualquer sequência sinal apropriada a partir de qualquer proteína adequada p.ex. uma sequência sinal que derive de albumina de rato. Alternativamente pode ser uma sequência modificada derivada de uma porção de localização nativa. No entanto, em cada caso será uma sequência que não ocorre "naturalmente" com a porção de agregação. A presença de uma sequência sinal numa proteína dirigirá o polipéptido nascente/complexo ribossômico para a membrana do RE onde se poderá inserir. A translocação através da membrana do RE, e para dentro do lúmen do RE, pode então ocorrer, dependendo da hidrofobicidade da proteína.

A sequência sinal pode, dependendo da célula hospedeira escolhida para expressão de uma forma da proteína localizada na membrana, ser uma sequência sinal procariótica, p.ex. um líder de fosfatase alcalina, penicilinase, lpp, ou enterotoxina termo-estável II. Para expressão em levedura a sequência sinal pode ser, p.ex., o líder da invertase de levedura, o líder do factor alfa (incluindo os líderes dos factores de *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*, sendo este último descrito na Patente U.S. No. 5010182), ou o líder da fosfatase ácida, o líder da glucoamilase de *C. albicans* (EP 362179), ou o sinal descrito em WO 90/13646. Em expressão em células de mamífero, pode ser utilizada uma sequência sinal de mamífero tal como a da albumina de rato, ou alternativamente pode ser empregue uma sequência líder viral.

Esta porção de localização na membrana pode também incluir uma sequência âncora membranar e/ou uma sequência de paragem de transferência. Geralmente isto pode ser preferido para proteínas cujas propriedades intrínsecas (hidrófobas) podem, de outro modo, conduzi-las para serem segregadas ou localizarem-se extracelularmente, quando fundidas com um péptido sinal. Um domínio de âncora membranar pode ser

incorporado para evitar que a proteína inteira seja translocada para o lúmen do RE e, finalmente, segregada. Em geral, a proteína tem de estar orientada na superfície citosólica de qualquer proteína com a qual esteja associada de modo a que possa interagir com a proteína exógena no citoplasma.

Outros parceiros de ligação

Num aspecto do invento, a expressão localizada na membrana de uma proteína tal como tau ou um fragmento nuclear de tau pode ser utilizada para pesquisar parceiros de ligação específicos dessa proteína ou fragmento, p.ex. proteínas além da tau ou do fragmento nuclear de tau que se possam ligar à forma de tau ou de um fragmento desta localizada na membrana.

Assim, o presente invento refere-se também a métodos de pesquisa de parceiros de ligação específicos da proteína (p.ex. tau) de interesse, compreendendo o causar ou permitir a expressão da proteína localizada na membrana, colocação em contacto dessa proteína com um ou mais potenciais parceiros de ligação, e determinação de se o potencial parceiro de ligação se ligou à proteína localizada na membrana.

A detecção da ligação entre a proteína de interesse e um potencial parceiro de ligação pode ser realizada utilizando qualquer método adequado, tal como descrito em detalhe acima.

O método pode incluir o passo adicional de recuperação do parceiro de ligação específico assim identificado.

Deste modo, o presente invento permite a identificação de parceiros de ligação específicos de proteínas tais como tau, que podem representar outros parceiros de ligação patológicos de tais proteínas em agregados semelhantes aos da doença de Alzheimer.

Utilização de construções de ácido nucleico

Numa concretização preferida, o polipéptido de fusão (ligado) (do passo (a)) acima é introduzido na célula através de expressão nesta sob o controlo de transcrição de um

promotor constitutivo, enquanto a segunda proteína ("livre") (do passo (b)) é introduzida através de expressão aí sob o controlo de transcrição de um promotor indutível, na presença do agente indutor apropriado. Alternativamente, no sentido inverso, as proteínas (a) e (b) podem ser expressas de forma indutível e de forma constitutiva, respectivamente.

Este sistema pode ser utilizado para controlar o nível ou a temporização da agregação na célula.

Particularmente preferida é a seguinte configuração para um ensaio da ligação tau-tau baseado em células: Um fragmento de tau correspondendo à unidade de tau truncada do PHF nuclear é constitutivamente expresso numa forma localizada na membrana numa célula hospedeira, de modo a expor o local de ligação tau-tau de elevada afinidade dentro da região de repetição em cadeia, e a um nível que não mata as células - i.e. numa linha celular estável. O fragmento de tau é de preferência maior do que o fragmento do domínio de repetição nuclear (adequadamente os resíduos de aminoácidos 186-390 ou 186-441 da tau inteira), que é capaz de alcançar um equilíbrio entre a agregação e a toxicidade.

Os ácidos nucleicos de, ou para utilização no, presente invento podem ser proporcionados isolados e/ou purificados a partir do seu ambiente natural, na forma substancialmente pura ou homogénea, ou livres ou substancialmente livres de outros ácidos nucleicos da espécie de origem. Quando aqui utilizado, o termo "isolado" engloba todas estas possibilidades.

Um ácido nucleico codificando o polipéptido de fusão será pelo menos parcialmente sintético porque compreenderá sequências de ácido nucleico que não se verificam juntas na natureza (não seguem contiguamente), mas que foram ligadas ou combinadas artificialmente de outro modo.

O ácido nucleico de acordo com o presente invento pode estar na forma de, ou ser derivado de, ADNc, ARN, ADN genómico e ácidos nucleicos modificados ou análogos de ácidos nucleicos. Quando uma sequência de ADN é especificada, p.ex. com referência a uma figura, a menos que o contexto exija de

outro modo, o ARN equivalente, com U substituído por T onde ocorre, está englobado.

Em particular, os ácidos nucleicos podem compreender, consistir ou consistem essencialmente em qualquer uma das sequências aqui divulgadas (que podem ser um gene, um clone genómico ou outra sequência, um ADNc, ou um ORF ou exão de qualquer uma destas, etc.). Quando um ácido nucleico (ou sequência nucleotídica) do invento é aqui referido, o complemento desse ácido nucleico (ou sequência nucleotídica) estará também englobado pelo invento. O "complemento" em cada caso tem o mesmo comprimento que a referência, mas é 100% complementar a esta pelo que cada nucleótido tem bases emparelhadas com o seu equivalente i.e. G com C, e A com T ou U.

Assim o invento refere-se também, noutro aspecto, a uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência nucleotídica codificando uma proteína de fusão discutida acima p.ex. uma proteína de doença de agregação ou o seu domínio de repetição em cadeia (i.e. uma proteína ou fragmento desta que esteja implicado num distúrbio neurodegenerativo tal como doença de Alzheimer) ligado a uma sequência sinal e, se necessário, uma sequência codificando um domínio âncora membranar ou uma sequência de paragem de transferência, através do qual o polipéptido codificado ficará inserido na membrana do RE.

A molécula de ácido nucleico codificando a proteína de interesse ligada à sequência sinal pode também opcionalmente incluir uma sequência 3'UTR exógena, p.ex. uma sequência derivada da globina de rato. A natureza da 3'UTR parece influenciar a eficiência de direccionamento de uma proteína para o RE nas células, e a sequência 3'UTR pode assim ser seleccionada em conformidade (Partridge, K.A., et al. (1999) *Cytotechnology* 30: 37-47).

Tal como descrito acima, os ácidos nucleicos podem codificar derivados ou outras variantes partilhando homologia com as sequências de referência em questão. De preferência, o ácido nucleico e/ou a sequência de aminoácidos em questão partilhariam cerca de 50%, ou 60%, ou 70%, ou 80% de

identidade, ainda de preferência pelo menos cerca de 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% da sequência em que a variante se baseia. A semelhança ou homologia pode ser tal como definido e determinado pelo programa TBLASTN, de Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-10, que está em uso padrão na técnica, ou, e este pode ser preferido, o programa padrão BestFit, que é parte do Pacote de Wisconsin, Versão 8, Setembro de 1994, (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EUA, Wisconsin 53711), utilizando os parâmetros por defeito. Uma fórmula comum para cálculo das condições de rigor necessárias para alcançar hibridação entre moléculas de ácido nucleico de uma homologia de sequência especificada é: $T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 \text{ Log}[\text{Na}^+] + 0,41 (\% \text{ de G+C}) - 0,63 (\% \text{ de formamida}) - 600/\text{\#pb no dúplex}$.

Sequências de ácido nucleico que codificam um polipéptido ou péptido ligado a uma sequência sinal de acordo com o presente invento podem ser prontamente preparadas pelo perito utilizando a informação e as referências aqui contidas e técnicas conhecidas na arte (por exemplo, ver Sambrook, Fritsch e Maniatis, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, e Ausubel *et al.*, "Short Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, 1992). Estas técnicas incluem (i) a utilização da reacção em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar amostras do ácido nucleico relevante, p.ex. a partir de fontes genómicas, (ii) síntese química, ou (iii) preparação de sequências de ADNc. O ácido nucleico assim preparado pode então ser ligado a uma sequência codificando um péptido sinal adequado, ou pode ser inserido numa construção de vector que inclui uma tal sequência codificando o péptido sinal. Outros métodos adequados para adaptação à síntese da proteína localizada na membrana em cultura de células de vertebrado recombinantes são descritos em Gething *et al.*, *Nature*, 293: 620-695 (1981); Mantei *et al.*, *Nature*, 281: 40-46 (1979); EP 117060; e EP 117058.

ADN codificando p.ex. fragmentos nucleares de tau pode ser gerado e utilizado em qualquer modo adequado conhecido dos peritos na técnica, incluindo toma de ADN de codificação, identificação de locais de reconhecimento de enzimas de restrição adequados em ambos os lados da porção a expressar,

e corte da referida porção do ADN. Modificações nas sequências codificando a proteína (p.ex. tau) podem ser feitas, p.ex. utilizando mutagénese dirigida ao local.

Construções

Nas concretizações de ensaio baseado em células do presente invento, a construção de uma forma localizada na membrana da proteína de interesse, p.ex. tau ou um fragmento de tau, pode ser conseguida causando ou permitindo a expressão numa célula de uma construção de expressão ou vector, que compreende ácido nucleico codificando a proteína dada ligada a uma sequência sinal e, quando necessário, uma sequência âncora ou de paragem de transferência, e que opcionalmente inclui também uma sequência 3'UTR exógena.

Em geral, o ácido nucleico codificando a sequência sinal à qual a molécula de proteína nascente está ligada pode ser um componente do próprio vector, ou pode ser uma parte do ADN codificando a proteína exógena que é inserida no vector.

A construção pode incluir quaisquer outras sequências reguladoras ou elementos estruturais tal como seriam vulgarmente incluídos num tal sistema e como é descrito abaixo. Assim como a sequência sinal, os componentes do vector incluirão habitualmente, mas não estão limitados a, um ou mais de uma origem de replicação, um ou mais genes marcadores, um elemento estimulador, um promotor, e uma sequência de terminação da transcrição. A construção de vectores adequados contendo um ou mais destes componentes emprega técnicas de ligação padrão que são conhecidas do perito na técnica.

As sequências de ácido nucleico que permitem que um vector se replique numa ou mais células hospedeiras seleccionadas são bem conhecidas para uma variedade de bactérias, leveduras e vírus. Por exemplo, várias origens virais (SV40, poliovírus, adenovírus, VSV ou BPV) são úteis para vectores de clonagem em células de mamíferos.

Particularmente preferido é um vector de expressão compreendendo um ácido nucleico tal como aqui descrito. O

vector pode, por exemplo, estar na forma de um plasmídeo, cosmídeo, partícula viral, fago ou qualquer outro vector ou construção adequado que possa ser tomado por uma célula e utilizado para expressar uma forma localizada na membrana da proteína de doença de agregação, p.ex. tau ou fragmento nuclear de tau.

Os vectores de expressão contêm habitualmente um promotor que está operativamente ligado à sequência de ácido nucleico codificando a proteína de interesse, de modo a dirigir a síntese de ARNm. Promotores reconhecidos por uma variedade de potenciais células hospedeiras são bem conhecidos. "Operativamente ligado" significa unido como parte da mesma molécula de ácido nucleico, adequadamente posicionado e orientado para que a transcrição seja iniciada a partir do promotor. ADN operativamente ligado a um promotor está "sob controlo da transcrição" do promotor. A transcrição a partir de vectores em células hospedeiras de mamífero é controlada, por exemplo, através de promotores obtidos dos genomas de vírus tais como o vírus de políoma, vírus da varíola aviária, adenovírus (tal como Adenovírus 2), vírus do papiloma bovino, vírus de sarcoma aviário, citomegalovírus, um retrovírus, vírus da hepatite B e Vírus Símio 40 (SV40), a partir de promotores de mamífero heterólogos, p.ex. o promotor da actina ou um promotor de imunoglobulina, e a partir de promotores de choque térmico, desde que tais promotores sejam compatíveis com os sistemas celulares hospedeiros.

Os vectores de expressão utilizados em células hospedeiras eucarióticas (células de levedura, fungos, insecto, vegetais, animais, humanas ou nucleadas de outros organismos multicelulares) conterão também as sequências necessárias para a terminação da transcrição e para a estabilização do ARNm.

O promotor pode ser "indutível" - o mesmo é dizer, tal como é bem compreendido pelos peritos na técnica, que a expressão é "ligada" ou aumentada em resposta a um estímulo aplicado. A natureza do estímulo varia entre os promotores. Alguns promotores indutíveis causam níveis pequenos ou indetectáveis de expressão (ou nenhuma expressão) na ausência

do estímulo apropriado. Outros promotores indutíveis causam expressão constitutiva detectável na ausência do estímulo. Seja qual for o nível de expressão na ausência do estímulo, a expressão a partir de qualquer promotor indutível é aumentada na presença do estímulo correcto. Nas experiências abaixo, foi utilizado um promotor indutível Lac.

Os vectores de expressão do invento podem também conter um ou mais genes de selecção. Os genes de selecção típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas p.ex. ampicilina, neomicina, metotrexato, ou tetraciclina, (b) complementam deficiências auxotróficas, ou (c) fornecem nutrientes críticos não disponíveis em meios complexos, p.ex., o gene codificando D-alanina-racemase para *Bacilli*. Um exemplo de marcadores seleccionáveis adequados para células de mamífero são os que permitem a identificação de células competentes para tomar o dado ácido nucleico codificando a proteína direccionada à membrana, tal como DHFR ou timidina-cinase. Uma célula hospedeira apropriada, quando é empregue DHFR de tipo selvagem, é a linha celular CHO deficiente na actividade de DHFR, preparada e propagada tal como descrito por Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980). Um gene de selecção adequado para utilização em levedura é o gene *trp1* presente no plasmídeo de levedura Rp7 (Stinchcomb et al., *Nature*, 282: 39 (1979); Kingsman et al., *Gene*, 7: 141 (1979); Tschemper et al., *Gene*, 10: 157 (1980)). O gene *trp1* proporciona um marcador de selecção para uma estirpe mutante de levedura sem a capacidade de crescer em triptofano, por exemplo, ATCC: No. 44076 ou PEP4-1 (Jones, *Genetics*, 85: 12 (1977)).

Transformação

O método referido acima pode portanto incluir ainda a introdução do ácido nucleico numa célula hospedeira. A introdução, que pode (particularmente para introdução *in vitro*) ser geralmente referida sem limitação como "transformação", pode empregar qualquer técnica disponível. Para células eucarióticas, técnicas adequadas podem incluir transfecção com fosfato de cálcio, DEAE-Dextrano, electroporação, transfecção mediada por lipossomas e

transdução utilizando retrovírus ou outros vírus, por exemplo, vacínia ou, para células de insecto, baculovírus.

O tratamento com cálcio empregando cloreto de cálcio, tal como descrito em Sambrook *et al.*, *supra*, ou electroporação é geralmente utilizado para procariotas ou outras células que contenham barreiras substanciais de parede celular. A infecção com *Agrobacterium tumefaciens* é utilizada para transformação de certas células vegetais, tal como descrito por Shaw *et al.*, *Gene*, 23: 315 (1983) e WO 89/05859 publicado a 29 de Junho de 1989.

Para células de mamífero sem tais paredes celulares, pode ser empregue o método de precipitação com fosfato de cálcio de Graham e van der Eb, *Virology* 52: 456-457 (1978). Aspectos gerais das transformações de sistemas de células hospedeiras de mamífero foram descritos na Patente U.S. No. 4399216. As transformações para levedura são tipicamente efectuadas de acordo com o método de Van Solingen *et al.*, *J. Bact.*, 130: 946 (1977) e Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA)*, 76: 3829 (1979). No entanto, podem também ser utilizados outros métodos para introdução de ADN em células, tais como através de microinjecção nuclear, electroporação, fusão de protoplastos bacterianos com células intactas, ou policatiões, p.ex. polibreno, poliornitina. Para várias técnicas para transformação de células de mamífero, ver Keown *et al.*, *Methods in Enzymology*, 185: 527-537 (1990) e Mansour *et al.*, *Nature* 336: 348-352 (1988).

Células hospedeiras

As células hospedeiras adequadas para utilização no invento podem incluir bactérias, células eucarióticas tais como células de mamífero e levedura, e sistemas de baculovírus.

As linhas celulares de mamífero disponíveis na arte para expressão de um polipéptido heterólogo incluem fibroblastos 3T6, células HeLa, células de rim de hamster bebé, células COS, linha CV1 de rim de macaco transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), células de ovário de hamster chinês/-DHFR (CHO, Urlaub e Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 77: 4216

(1980)); células de Sertoli de ratinho (TM4, *Mather, Biol. Reprod.* 23: 243-251 (1980)); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); células de tumor mamário de ratinho (MMT 060562, ATCC CCL51); e muitas outras. Preferidas podem ser qualquer uma de uma variedade de linhas celulares de neuroblastoma bem conhecidas p.ex. N2A, N1E, SY5Y.

Hospedeiros procarióticos adequados incluem, mas não se limitam a, eubactérias, tais como organismos Gram-negativos ou Gram-positivos, por exemplo, *Enterobacteriaceae* tal como *E. coli*. Várias estirpes de *E. coli* estão disponíveis ao público, tais como a estirpe de *E. coli* K12 MM294 (ATCC 31446); *E. coli* X1776 (ATCC 31537); estirpes de *E. coli* W3110 (ATCC 27325) e K5 772 (ATCC 53635). Micróbios eucarióticos tais como fungos filamentosos ou leveduras são também adequados para clonagem ou hospedeiros de expressão para vectores. *Saccharomyces cerevisiae* é um microorganismo hospedeiro eucariótico inferior vulgarmente utilizado. A selecção da célula hospedeira apropriada é considerada estar dentro da perícia na técnica.

Noutro aspecto, o presente invento proporciona uma célula hospedeira contendo o ácido nucleico heterólogo do presente invento tal como descrito acima. O ácido nucleico do invento pode ser integrado no genoma (p.ex. cromossoma) da célula hospedeira. A integração pode ser promovida através da inclusão de sequências que promovem a recombinação com o genoma, de acordo com técnicas padrão. Alternativamente, o ácido nucleico pode estar num vector extracromossómico dentro da célula, ou de outro modo ser heterólogo identificável ou estranho à célula. Geralmente a linha celular será capaz de expressar uma forma localizada na membrana de uma proteína tal como tau ou um derivado desta, sendo a linha celular transformada com o ácido nucleico codificando a proteína ou derivado desta. As linhas celulares preferidas podem basear-se na linha celular de fibroblastos, p.ex. 3T6.

Produtos de expressão

As células hospedeiras transfectadas ou transformadas com os vectores de expressão ou de clonagem aqui descritos

para a produção da proteína localizada na membrana podem ser cultivadas em meios nutrientes convencionais modificados conforme apropriado para indução de promotores, selecção de transformantes ou amplificação dos genes que codificam as sequências desejadas. As condições de cultura, tais como meios, temperatura, pH e semelhantes, podem ser seleccionadas pelo perito na técnica sem demasiada experimentação. Em geral, os princípios, protocolos e as técnicas práticas para maximização da produtividade de culturas celulares podem ser verificados em "Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach", M. Butler, ed. JRL Press, (1991) e Sambrook et al., *supra*.

A expressão do gene pode ser confirmada directamente numa amostra, por exemplo, através de *Southern blotting*, *Northern blotting* convencionais para quantificar a transcrição de ARNm (Thomas, *Proc. Natl Acad Sci. EUA*, 77: 5201-5205 (1980)), *dot blotting* (análise de ADN), ou hibridação *in situ*, utilizando uma sonda apropriadamente marcada, com base na sequência da proteína de doença de agregação. Alternativamente, podem ser empregues anticorpos que podem reconhecer dúplexes específicos, incluindo dúplexes de ADN, dúplexes de ARN, e dúplexes híbridos ADN-ARN ou dúplexes de ADN-proteína.

A expressão do gene pode, alternativamente, ser medida através de métodos imunológicos, tais como coloração imuno-histoquímica de células ou secções de tecido, e ensaio de cultura celular, para quantificar directamente a expressão do produto do gene. Anticorpos úteis para coloração imuno-histoquímica e/ou ensaio de fluidos da amostra podem ser monoclonais ou policlonais, e podem ser preparados em qualquer mamífero. Convenientemente, os anticorpos podem ser preparados contra uma sequência nativa do polipéptido de doença de agregação.

Assim um aspecto do presente invento implica causar ou permitir a expressão a partir dos ácidos nucleicos aqui discutidos, p.ex. através de cultura das células hospedeiras (que podem incluir células realmente transformadas, embora o mais provável é as células serem descendentes das células

transformadas), sob condições para expressão do gene, para que seja produzido o polipéptido (ou péptido) codificado.

O presente invento engloba também um método de produção de um polipéptido ou péptido localizado na membrana do aspecto anterior, o método incluindo a expressão a partir do ácido nucleico tal como descrito acima. Como alternativa ao crescimento numa cultura de uma célula hospedeira que contém um tal vector, sob condições adequadas que causam ou permitem a expressão do polipéptido, os polipéptidos e péptidos podem ser expressos num sistema *in vitro*, tal como um sistema de lisado de reticulócitos, tal como aqui descrito.

Geralmente, após produção através de expressão, o polipeptídeo de fusão codificado será utilizado no ambiente das células em que é expresso, ou seja, sem ser isolado das membranas em que está localizado. Deste modo, tal como discutido acima, foi surpreendentemente verificado pelos presentes inventores que a forma localizada na membrana da proteína pode ser utilizada para semear a agregação de mais moléculas de proteína de um modo que imita a agregação de proteínas semelhante à doença de Alzheimer. Assim, as células apresentando agregados de proteínas localizadas na membrana semelhantes à doença de Alzheimer nas suas membranas (p.ex. membranas de RE) pode ser utilizado noutros ensaios de pesquisa (para uma discussão destes, ver abaixo).

No entanto, os polipéptidos do invento podem ser isolados e/ou purificados a partir da célula hospedeira e/ou do meio de cultura, quer na forma de uma fracção membranar quer isolados a partir das próprias membranas, conforme seja o caso. As proteínas podem ser purificadas até à homogeneidade essencial através de métodos conhecidos, tais como, por exemplo, através de centrifugação a diferentes velocidades, através de precipitação com sulfato de amónio, através de diálise (à pressão normal ou a pressão reduzida), através de focagem isoeléctrica preparativa, através de electroforese preparativa em gel ou através de vários métodos cromatográficos, tais como filtração em gel, cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), cromatografia de permuta iónica, cromatografia de fase inversa e cromatografia de

afinidade (p.ex. em Sepharose (TM) Blue CL-6B ou em anticorpos monoclonais ligados a transportador).

Assim, o invento refere-se, noutro aspecto, a um polipéptido codificado por um ácido nucleico tal como proporcionado num aspecto anterior, p.ex. um polipéptido ou fragmento deste (por exemplo baseado em tau ou num fragmento nuclear de tau), ligado a um péptido sinal e (se necessário) uma âncora e/ou sequência de paragem de transferência. Numa concretização preferida, o polipéptido compreende a proteína de doença de agregação, p.ex. a proteína tau, ou um derivado desta. De maior preferência, a proteína compreende um fragmento nuclear de tau, tal como descrito acima.

Modelo in vitro

A forma localizada na membrana da proteína de interesse descrita acima pode ser utilizada em modelos *in vitro*.

Por exemplo, pode ser utilizada de forma análoga à do fragmento de tau utilizado no ensaio de WO 96/30766 que é aqui incorporado por referência cruzada. Tal como descrito acima, neste ensaio de agregação de tau e inibidores desta, um fragmento de tau correspondendo ao domínio de repetição nuclear é adsorvido num substrato de fase sólida. Este é capaz de capturar a tau inteira solúvel e de se ligar com elevada afinidade. A combinação destas duas estratégias (localização na membrana, fase sólida *in vitro*) pode ser vantajosa em certos contextos.

Como outra alternativa aos métodos baseados em células descritos acima, o método de modelação pode ser efectuado *in vitro*, causando a expressão num sistema de expressão proteica *in vitro* de uma forma localizada na membrana da proteína de interesse. Por exemplo, um meio *in vitro* contendo microssomas (que podem ser facilmente produzidos através de fragmentação do retículo endoplasmático), ribossomas, moléculas de ARNt, e ARNm codificando a proteína ou fragmento proteico de interesse ligado a uma sequência sinal, bem como quaisquer outros factores solúveis necessários para a síntese e translocação da proteína, podem ser utilizados para sintetizar uma forma ligada à membrana da proteína. Aqui, de

um modo semelhante ao sistema baseado em células acima descrito, os ribossomas tornar-se-ão ligados à membrana microssômica (que é equivalente à membrana do RE do sistema baseado em células) e causam a síntese da molécula polipeptídica codificada.

Nesta última concretização, no entanto, a construção que codifica a proteína de doença de agregação, a sequência sinal e as sequências âncora e/ou de paragem de transferência (se necessário), são todas desenhadas de preferência de modo a que a maior parte da molécula de proteína codificada, quando inserida na membrana microssômica, se projecte a partir da superfície citosólica da membrana em vez de para dentro do lúmen. Desta modo, a molécula de proteína estará acessível tanto a outras moléculas de proteína (permitindo assim que ocorra agregação de doença semelhante a Alzheimer na superfície citosólica do microssoma) como para testar agentes num ensaio de pesquisa para pesquisar potenciais inibidores ou moduladores da tal agregação.

Os peritos estarão familiarizados com o desenho de construções adequadas para alcançar as topologias proteicas desejadas. Maior discussão deste ponto será dada abaixo.

Assim, a característica comum que liga os sistemas modelo baseados em células e *in vitro* aqui proporcionados é a síntese de uma forma localizada na membrana da proteína de doença de agregação ou fragmento proteico. Esta característica comum dá origem a um método de geração de uma molécula semente, que pode propagar a agregação de mais moléculas de proteína de um modo que imita a agregação patológica de proteínas tal como tau durante a formação de p.ex. emaranhados neurofibrilhares.

Deteção de interacção de polimerização induzida

Em várias concretizações, o progresso da agregação (ou modulação da agregação) pode ser detectado directamente ou indirectamente através de monitorização da concentração ou do nível de qualquer uma ou mais das seguintes espécies: um agregado da proteína de fusão e/ou segunda proteína (p.ex. com base em coeficientes de sedimentação) ou um fragmento

proteolítico de qualquer um destes (que geralmente aumentará com a agregação); uma espécie correspondendo ao polipéptido de fusão e/ou segunda proteína não agregado (que pode diminuir).

Assim, tal como exemplificado com determinadas fusões de tau e proteínas tau (com base no fragmento 190-441 de 40 kDa e T40), a agregação pode ser monitorizada com base no aumento dos níveis de uma espécie processada de 25 kDa, derivada tanto da fusão como de proteínas mais longas (ver Figura 1).

Pode ser desejável que a segunda proteína ("livre") utilizada no método seja marcada, ou de outra forma distinguível da proteína ligada à membrana, p.ex. imunologicamente distinta, para auxiliar na detecção do grau de agregação das moléculas de proteína.

Por exemplo, a forma livre da proteína de doença de agregação pode ser ligada a uma molécula repórter. O termo "molécula repórter", tal como utilizado na presente especificação, pretende significar uma molécula que, pela sua natureza química, proporciona um sinal analiticamente detectável que permite a detecção de anticorpo ligado ao antigénio. A detecção deve de preferência ser quantificável, para permitir a determinação da quantidade de antigénio na amostra; isto pode ser calculado em termos absolutos, ou pode ser realizada em comparação com um padrão (ou série de padrões) contendo um nível normal de antigénio conhecido. Os exemplos são bem conhecidos dos peritos na arte p.ex. enzimas ou fluoróforos.

Assim, a forma livre da proteína pode ser directamente modificada (p.ex. marcada com um marcador radioactivo ou enzimaticamente detectável) ou conjugada (p.ex. com um fluoróforo) num domínio da molécula, por exemplo o segmento N-terminal, que se sabe não estar envolvido no local de ligação tau-tau de elevada afinidade, de modo a que funcione assim tanto como o ligando no ensaio de ligação tau-tau como como molécula repórter.

Quando anticorpos ou fragmentos destes são utilizados em concretizações do método do presente invento estes podem ser

produzidos através de técnicas convencionais. Os anticorpos policlonais podem ser criados p.ex. através de injeção do correspondente antigénio de tau num animal, de preferência um coelho, e recuperação do anti-soro através de purificação de imunoafinidade, na qual o anticorpo policlonal é passado através de uma coluna na qual o antigénio está ligado e é então eluído de um modo convencional. De preferência, o invento utilizará anticorpos monoclonais que são selectivos para epitopos de tau que podem ser preparados através do método de Kohler e Milstein. Os anticorpos monoclonais adequados para epitopos de tau podem ser modificados através de métodos conhecidos para proporcionar fragmentos Fab ou fragmentos (Fab')₂, quiméricos, humanizados ou concretizações de anticorpo de cadeia simples. Os anticorpos de acordo com o presente invento podem ser modificados de vários modos. De facto o termo "anticorpo" deve ser construído como cobrindo qualquer substância de ligação possuindo um domínio de ligação com a especificidade necessária. Assim o invento cobre fragmentos de anticorpo, derivados, equivalentes funcionais e homólogos de anticorpos, incluindo moléculas sintéticas e moléculas cuja forma imita a de um anticorpo permitindo-lhes ligar-se a um antigénio ou epitopo.

De um modo geral, quando são empregues anticorpos para detecção, o anticorpo pode possuir uma molécula repórter. Alternativamente, a detecção de ligação pode ser realizada através da utilização de um segundo anticorpo capaz de se ligar a um primeiro anticorpo não marcado, específico de tau. Neste caso, o segundo anticorpo é ligado a uma molécula repórter.

Os anticorpos podem ser utilizados em qualquer sistema de imunoensaio conhecido na arte, incluindo, mas não se limitando a: radioimunoensaios, ensaios em "sanduíche", ensaios imunossorventes ligados a enzima (ELISA); imunoensaios fluorescentes, imunoensaios de proteína A, etc. Tipicamente, é utilizado um método de imunotransferência. De preferência, o imunoensaio é realizado na fase sólida, tal como será bem conhecido do perito. Por exemplo, um anticorpo pode ser adsorvido, p.ex., numa coluna de ensaio, e a amostra celular pode então ser lavada através da coluna sob condições adequadas para permitir a ligação ao anticorpo em fase sólida

de qualquer agregado da proteína de interesse, p.ex. um agregado tau-tau, que está presente na membrana da célula. O excesso de reagente é lavado, e a ligação da proteína agregada à coluna pode então ser detectada através de qualquer meio adequado, p.ex. tal como exemplificado acima e abaixo.

Anticorpos monoclonais preferidos são como se segue:

- Os que reconhecem o terminal N ou o terminal C do epitopo de tau permitem a medição da ligação entre espécies de tau truncadas e inteiras. Especialmente úteis são anticorpos que reconhecem epitopos específicos de humano. Um tal anticorpo monoclonal (designado 27/499) reconhece um epitopo específico de humano localizado na região entre Gly-16 e Gln-26 de tau e permite, deste modo, a medição da ligação entre espécies de tau inteira, desde que uma seja derivada de uma fonte não humana (Lai (1995); "The role of abnormal phosphorylation of tau protein in the development of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease", PhD Thesis, University of Cambridge).

- Os que reconhecem o fragmento central de tau truncado em Glu-391. Um exemplo é o mAb 423 (Novak *et al.* (1993), *loc. cit.*). Este anticorpo permite a detecção da ligação de um fragmento central de tau truncado terminando em Glu-391 a um fragmento semelhante terminando em Ala-390, que não é reconhecido pelo mAb 423. Esta truncagem ocorre naturalmente no decurso de montagem de PHF na doença de Alzheimer (Mena *et al.* (1995), (1996), *loc. cit.*; Novak *et al.* (1993), *loc. cit.*; Mena *et al.* (1991), *loc. cit.*). Além disso, quando a tau está ligada através do domínio de repetição *in vitro*, a digestão com uma protease (p.ex. pronase) gera um fragmento detectável por mAb 423 (ver Wischik *et al.*, 1996, *loc. cit.*). A Figura 17 mostra várias espécies derivadas de tau que podem ser geradas num ensaio de acordo com o presente invento, e o ponto de truncagem aproximado em cada uma. O mAb 423 pode assim ser utilizado para demonstrar que a conformação molecular da interacção de ligação tau-tau gerada num sistema modelo localizado na membrana tal como aqui proporcionado corresponde à que ocorre patologicamente no cérebro, e assim que tais sistemas modelo de acordo com o presente invento

representam modelos viáveis de agregação de proteínas semelhante a doença de Alzheimer.

- Os que reconhecem um epitopo de tau genérico no domínio de repetição. Uma concretização preferida utiliza um anticorpo (p.ex. MAb 7.51). Quando a agregação a detectar é tau-MAP2 ou MAP2-MAP2, pode ser utilizado um anticorpo que detecte um epitopo de MAP2 genérico. O anticorpo 7.51 reconhece um epitopo genérico de tau localizado na antepenúltima repetição de tau (Novak *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 5837-5841), que fica oclusa quando a tau se liga numa configuração imunoquímica semelhante à de PHF mas pode ser exposta após tratamento com ácido fórmico (Harrington *et al.* (1990), (1991), *loc. cit.*; Wischik *et al.* (1995a), *loc. cit.*). A tau solúvel normal, ou a tau ligada a microtúbulos, pode ser detectada utilizando mAb 7.51 sem tratamento com ácido fórmico (Harrington *et al.* (1991), *loc. cit.*; Wischik *et al.* (1995a), *loc. cit.*). A ligação da tau inteira no ensaio de ligação tau-tau está associada à oclusão parcial do epitopo do mAb 7.51.

O anticorpo 27/342 reconhece um epitopo genérico de tau não específico da espécie localizado entre Ser-208 e Ser238 que fica parcialmente ocluso no decurso da interacção tau-tau (Lai, *loc. cit.*).

Os locais de ligação de alguns anticorpos monoclonais são mostrados na Figura 4.

Pesquisa de moduladores e inibidores

Tal como descrito acima, o invento refere-se, de preferência, à utilização de uma molécula de ácido nucleico, polipéptido ou derivado deste, uma célula hospedeira, ou um sistema de expressão de proteínas *in vitro*, tal como aqui proporcionado, num método de modelação de agregação de proteínas semelhante à doença Alzheimer. Os métodos do invento podem incluir os passos de causar a expressão da molécula de ácido nucleico num sistema de expressão baseado em células ou baseado em microssomas, para que o polipéptido codificado fique localizado numa membrana (p.ex. a membrana

do RE) da célula, ou na membrana microssômica, respectivamente.

Num aspecto preferido, é divulgado um método de identificação de um agente terapêutico para tratamento de uma doença, tal como aqui discutido, método esse que compreende o passo de proporcionar o polipéptido de fusão (e de preferência, a segunda proteína discutida acima) e de colocar em contacto a proteína localizada na membrana com substâncias de teste que se suspeite serem inibidores ou moduladores de agregação de proteínas associada a doença. Em particular, os polipéptidos de fusão produzidos através dos métodos de modelização descritos acima podem ser utilizados para investigar e pesquisar potenciais inibidores ou moduladores de agregação de proteínas semelhante a doença de Alzheimer, tal como a associação patológica tau-tau.

Assim, os vários métodos descritos acima podem compreender os passos adicionais de (c) colocar em contacto o polipéptido de fusão e/ou a segunda proteína com um ou mais agentes que se deseja avaliar quanto à capacidade para modularem ou inibirem a agregação; (d) monitorização da extensão de agregação, e opcionalmente correlação da extensão de agregação com a actividade moduladora do agente ou agentes.

Assim, um método de identificação de um modulador de agregação (de preferência intracelular) de uma proteína associada a uma doença em que a proteína sofre uma interacção conformacional induzida, pode compreender a realização de um método para induzir agregação tal como descrito acima na presença de um ou mais agentes suspeitos de serem capazes de modular (p.ex. inibindo ou invertendo) a agregação. O grau de agregação (e opcionalmente o processamento proteolítico) pode ser observado na presença ou ausência do agente, e os valores relativos correlacionados com a sua actividade como modulador.

De preferência, quando o método de pesquisa emprega células que expressam uma forma localizada na membrana da proteína de interesse, tal como tau, este pode incluir, p.ex., células de uma linha celular neuronal, p.ex. uma linha

celular de neuroblastoma ou células de uma linha de fibroblastos. Numa concretização preferida, as células são de uma linha de fibroblastos 3T6.

Numa concretização, o presente invento refere-se a um método de pesquisa de agentes que sejam capazes de modular ou inibir a agregação de proteínas semelhante a doença de Alzheimer, p.ex. associação tau-tau patológica, o método compreendendo:

(1) causar ou permitir a síntese de uma forma localizada na membrana da proteína de doença de agregação (p.ex. tau ou MAP2), ou um fragmento nuclear desta (p.ex. o domínio de repetição em cadeia nuclear de tau ou MAP2);

(2) colocar em contacto o referido polipéptido de fusão ou derivado com:

(A) um ou mais agentes suspeitos de serem capazes de modular ou inibir a agregação das moléculas de proteína de doença de agregação, e

(B) outra proteína de doença de agregação ou fragmento nuclear desta, que seja capaz de se ligar à proteína associada à membrana do passo (1); e

(3) detecção da ligação, se houver, da proteína do passo (2)(b) com o polipéptido de fusão do passo (1).

A proteína semelhante a tau utilizada no passo (2B) acima pode, em certas concretizações, ser uma forma "livre" da proteína, cujo termo é aqui utilizado para a distinguir da proteína de doença de agregação ligada à membrana do passo (1). No entanto, "livre" não pretende excluir a possibilidade da proteína de doença de agregação estar complexada com, ou de outra forma associada a, outras moléculas ou porções tais como porções hidrato de carbono ou outros péptidos.

Por exemplo, uma substância de teste pode ser adicionada a um sistema celular tal como descrito acima, e as células incubadas durante um período de tempo suficiente para permitir a ligação e demonstrar inibição da ligação. O complexo da tau ligada, pode então ser detectado, p.ex. utilizando um anticorpo marcado adequadamente, tal como o MAb 7.51 num *immunoblot* do extracto celular total, ou qualquer outro método de detecção adequado. Se desejado, a proteína tau ligada à membrana pode ser distinguida da proteína tau

livre agregada, por exemplo através de terminação da sequência da proteína tau ligada à membrana no aminoácido 390. A tau livre agregada será proteoliticamente clivada no aminoácido Gly 391, que pode ser detectada por um anticorpo específico para esse epitopo (p.ex. MAb 423).

Quando um método de pesquisa é empregue para este fim, i.e. para a identificação de compostos moduladores/inibidores, pode ser utilizado um ensaio não competitivo ou competitivo. Por exemplo, num ensaio competitivo do tipo bem conhecido na técnica, o efeito de um inibidor ou modulador conhecido na agregação semelhante a doença de Alzheimer pode ser comparado na presença ou ausência de outras substâncias ou agentes de teste, para determinar a capacidade da substância de teste para competir com o inibidor/modulador conhecido pela ligação à proteína de interesse.

Escolha do composto de teste

Os compostos que são testados podem ser qualquer um que seja desejado avaliar quanto à actividade relevante.

Os métodos podem servir como pesquisas primárias, para identificar novos inibidores/moduladores, ou como pesquisas secundárias para estudar inibidores/moduladores conhecidos com mais detalhe.

Os agentes podem ser compostos químicos naturais ou sintéticos. Os anticorpos que reconhecem um agregado de proteínas semelhante a doença de Alzheimer e/ou que modulam a agregação de proteínas semelhante a doença de Alzheimer formam uma classe de putativos compostos inibidores ou moduladores em relação ao processo de agregação. Mais habitualmente, serão testados compostos químicos relativamente pequenos, de preferência, que sejam capazes de atravessar a barreira hematoencefálica.

O perito apreciará que a quantidade de substância de teste ou composto que é adicionada num ensaio de pesquisa de acordo com este aspecto do invento será normalmente determinada através de tentativa e erro, dependendo do tipo

de composto utilizado. Pode ser seleccionada para ser um nível que possa ser utilizado de forma realista em contexto terapêutico i.e. não seria letal para um paciente.

Especificidade da inibição

Os métodos de pesquisa de acordo com este aspecto do presente invento podem ser utilizados para pesquisar compostos que demonstrem as propriedades de inibição competitiva selectiva de agregação de proteínas semelhante a doença de Alzheimer patológica (p.ex., ligação tau-tau ou tau-MAP2), sem interferência com a ligação normal de p.ex. tau ou MAP2 a tubulina através da mesma região da molécula (ver WO 96/30766).

Um método adequado para determinação de qualquer possível interferência da ligação de tau, MAP2 ou um derivado seu a tubulina através de potenciais inibidores/moduladores de agregação de proteínas semelhante a doença de Alzheimer, compreende o contacto de uma preparação de tubulina despolimerizada/MAP2 ou microtúbulos estabilizados com taxol com um agente suspeito de ser capaz de modular ou inibir a associação tau-tau ou tau-MAP2, juntamente com uma proteína ou derivado desta, tal como mencionado acima no passo (2) (b), seguido de detecção da ligação tau-tubulina ou MAP2-tubulina. A ligação tau-tubulina pode também, por exemplo, ser demonstrada por uma distribuição normal do citosqueleto, tal como descrito em p.ex. WO 96/30766.

Os métodos para a preparação de proteínas tubulina ou fragmentos destas, possivelmente em combinação com parceiros de ligação, são conhecidos na arte e são descritos p.ex. por Slobada et al. (1976, em: "Cell Mobility" (R. Goldman, T. Pollard e J. Rosenbaum, eds.), Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, págs. 1171-1212).

Viabilidade celular

Quando o método utiliza um sistema baseado em células, pode ainda incluir o passo de testar a viabilidade das células expressando a proteína de doença de agregação

localizada na membrana, p.ex. através da utilização de um estojo de ensaio de lactato-desidrogenase (Sigma).

No caso em que estiver a ser investigada a agregação tau-tau, tau-MAP2 ou MAP2-MAP2 (ver acima, em "especificidade"), este passo pode também proporcionar uma indicação de qualquer interferência pelo agente de teste na ligação de tau ou MAP2 à tubulina, uma vez que a inibição ou interferência da ligação tau-tubulina ou MAP2-tubulina se correlacionará, em certa medida, com uma menor capacidade das células para se dividirem, e, assim, com menor viabilidade celular.

Terapêutica e modos de administração

O desempenho de um método de ensaio de pesquisa de acordo com os vários aspectos acima pode ser seguido através do isolamento e/ou fabrico e/ou utilização de um composto, uma substância, ou uma molécula que teste positivo quanto à capacidade para interferir com, ou modular a, agregação de proteínas relacionada com doença.

Os compostos assim identificados podem ser formulados em composições para utilização no diagnóstico, prognóstico ou tratamento terapêutico de doença de Alzheimer ou semelhante (de facto, qualquer condição em que ocorra agregação de proteínas semelhante a doença de Alzheimer). Assim, o presente invento proporciona os meios para obter formulações farmacêuticas compreendendo um ou mais compostos inibidores ou moduladores tal como obteníveis através de um método de pesquisa tal como aqui proporcionado.

Após a identificação de uma substância ou agente que module ou afecte tal agregação de proteínas, a substância ou agente pode ser melhor investigado. Outros compostos inibidores/moduladores candidatos podem basear-se em modelação da estrutura tridimensional de um polipéptido ou fragmento peptídico e utilização do desenho racional de fármacos para proporcionar potenciais compostos inibidores com determinada forma molecular, tamanho e características de carga. Assim, é também aqui divulgada a utilização de um agente identificado utilizando um método de pesquisa aqui

proporcionado, ou uma porção, variante, análogo ou mimético derivado activo deste que seja capaz de inibir ou modular a agregação de proteínas semelhante a doença de Alzheimer, em pesquisa ou desenho de mais inibidores/moduladores de agregação semelhante a doença de Alzheimer.

Um composto que foi identificado tal como descrito acima pode ser fabricado e/ou pode ser utilizado na preparação, i.e. o fabrico ou a formulação, de uma composição tal como um medicamento, uma composição farmacêutica ou um fármaco. Estes podem ser administrados a indivíduos.

Geralmente, é proporcionado um tal inibidor ou modulador numa forma isolada e/ou purificada, i.e. substancialmente pura. Isto pode incluir estar numa composição onde representa pelo menos cerca de 90% do ingrediente activo, de preferência pelo menos cerca de 95%, de maior preferência pelo menos cerca de 98%. Uma tal composição pode, no entanto, incluir materiais transportadores inertes ou outros excipientes farmacologicamente e fisiologicamente aceitáveis. Tal como observado abaixo, uma tal composição pode incluir além de um composto inibidor/modulador tal como divulgado, uma ou mais outras moléculas de utilização terapêutica.

Deste modo, uma substância identificada tal como descrito acima, tal como um inibidor da agregação tau-tau ou de outra agregação de proteínas semelhante a doença de Alzheimer, pode ser proporcionada para utilização num método de tratamento do corpo humano ou animal de uma condição em que ocorre agregação de proteínas semelhante a doença de Alzheimer.

São também aqui descritos uma composição farmacêutica, um medicamento, um fármaco ou outra composição compreendendo uma substância do invento tal como descrito acima, um método compreendendo a administração de uma tal composição a um paciente, p.ex. para tratamento ou profilaxia da doença de Alzheimer ou de uma condição semelhante a doença de Alzheimer, a utilização de uma tal substância no fabrico de uma composição para administração, p.ex. para tratamento da doença de Alzheimer ou um tratamento semelhante, e um método de produção de uma composição farmacêutica compreendendo

mistura de uma substância com um excipiente farmacêuticamente aceitável, etc., tal como discutido abaixo.

Quer se trate de um polipéptido, um anticorpo, um péptido, uma molécula de ácido nucleico, uma molécula pequena, um composto mimético ou outro farmacêuticamente útil tal como aqui descrito a dar a um indivíduo, a administração é de preferência numa "quantidade profilacticamente eficaz" ou "quantidade terapêuticamente eficaz" (conforme possa ser o caso, embora a profilaxia possa ser considerada terapia), sendo esta suficiente para mostrar benefício para o indivíduo. A quantidade realmente administrada e a taxa e curso de tempo da administração, dependerão da natureza e gravidade do que está a ser tratado. A prescrição de tratamento, p.ex. decisões sobre dosagem etc., é da responsabilidade dos clínicos gerais e de outros médicos.

Uma composição pode ser administrada sozinha ou em combinação com outros tratamentos, simultaneamente ou sequencialmente dependente da condição a tratar.

As composições farmacêuticas tal como aqui descritas, podem incluir, além do ingrediente activo, um excipiente, transportador, tampão, estabilizador ou outros materiais farmacêuticamente aceitáveis bem conhecidos dos peritos na arte. Tais materiais devem ser não tóxicos e não devem interferir com a eficácia do ingrediente activo. A natureza exacta do transportador ou outro material dependerá da via de administração, que pode ser oral, ou através de injeção, p.ex., cutânea, subcutânea ou intravenosa.

As composições farmacêuticas para administração oral podem estar na forma de comprimido, cápsula, pó ou líquido. Um comprimido pode incluir um transportador sólido tal como gelatina ou um adjuvante. Composições farmacêuticas líquidas incluem geralmente um transportador líquido tal como água, petróleo, óleos animais ou vegetais, óleo mineral ou óleo sintético. Podem ser incluídas solução salina fisiológica, solução de dextrose ou outra solução de sacárido ou glicóis tais como etilenoglicol, propilenoglicol ou polietilenoglicol.

Para injeção intravenosa, cutânea ou subcutânea, ou injeção no local da aflição, o ingrediente activo estará na forma de uma solução aquosa parentericamente aceitável que é apirogénica e possui pH adequado, isotonicidade e estabilidade. Os peritos na arte relevante são bem capazes de preparar soluções adequadas utilizando, por exemplo, veículos isotónicos tais como Injeção de Cloreto de Sódio, Injeção de Ringer, Injeção de Ringer Lactado. Podem ser incluídos, conforme necessário, conservantes, estabilizantes, tampões, antioxidantes e/ou outros aditivos.

Exemplos de técnicas e protocolos acima mencionados podem ser verificados em "Remington Pharmaceutical Sciences", 16ª edição, Osol, A. (ed), 1980.

O agente pode ser administrado de uma maneira localizada ao cérebro ou a outro local desejado, ou pode ser distribuído sistemicamente de um modo que alcance o cérebro ou outras células. Por exemplo, podem ser utilizadas terapias de direccionamento para distribuir o agente activo mais especificamente a certos tipos de célula, através da utilização de sistemas de direccionamento, tais como anticorpos ou ligandos específicos de células. O direccionamento pode ser desejável por uma variedade de razões, por exemplo se o agente for inaceitavelmente tóxico, ou se de outro modo requerer uma dosagem demasiado elevada, ou se de outro modo não for capaz de entrar nas células alvo.

Em vez de administrar estes agentes directamente, eles podem ser administrados numa forma precursora, para conversão na forma activa através de um agente de activação produzido em, ou direccionado às células a tratar.

Um agente que é capaz de interferir com a agregação de proteínas semelhante a doença de Alzheimer pode ser proporcionado num estojo, p.ex. selado num recipiente adequado que proteja o seu conteúdo do ambiente externo. Tal estojo pode incluir instruções de utilização.

Animais

Embora grande parte da discussão anterior se tenha referido a ensaios em linhas celulares ou baseados *in vitro*, o invento aqui divulgado tem particular utilidade em ensaios baseados em animais.

Assim as células hospedeiras de acordo com o presente invento podem estar incluídas num animal transgênico, e o presente invento proporciona ainda um animal transgênico, compreendendo células que expressam um polipéptido de fusão de acordo com um aspecto anterior, tal como uma forma localizada na membrana do fragmento nuclear de tau. Tais animais podem ser preparados e/ou utilizados de modo análogo ao discutido em US 5912410 e 5898094.

Os organismos transgênicos do invento incluem todos, dentro de uma pluralidade das suas células, uma sequência de ADN recombinante clonada ou sintética, que se crê relacionar-se com a patogénese de uma doença de agregação de proteínas. Mais especificamente, os organismos transgênicos contêm sequências específicas de material genético exógeno, tais como as sequências descritas em detalhe acima, que são constituídas por uma sequência promotora específica do tecido e uma sequência que codifica para a produção de uma proteína direccionada à membrana. Uma vez que é possível produzir organismos transgênicos do invento utilizando uma ou mais das sequências acima descritas, será dada uma descrição geral da produção de organismos transgênicos através da referência geral ao material genético exógeno. Esta descrição geral pode ser adaptada pelos peritos na técnica para incorporar as sequências de ADN específicas acima descritas nos organismos e obter expressão dessas sequências utilizando os métodos e materiais descritos abaixo. Para mais detalhes em relação à produção de organismos transgênicos, e especificamente de ratinhos transgênicos, ver Pat. U.S. No. 4873191, concedida a 10 de Out. de 1989 e para as numerosas publicações científicas aí referidas e citadas.

O material genético exógeno pode ser colocado no pronúcleo masculino ou feminino do zigoto. De preferência, é colocado no pronúcleo masculino logo que possível após o

espermatozóide ter entrado no ovo. Por outras palavras, logo após a formação do pronúcleo masculino quando os pronúcleos estão claramente definidos e estão bem separados, estando cada um deles localizado próximo da membrana do zigoto. O pronúcleo masculino de um ovo de ratinho fertilizado é o local preferido para a adição do material genético exógeno do presente invento.

É preferível que o material genético exógeno seja adicionado ao complemento do ADN masculino do zigoto antes de ser processado pelo núcleo do óvulo ou o pronúcleo feminino do zigoto. Pensa-se que o núcleo do óvulo ou o pronúcleo feminino liberte moléculas que afectam o complemento do ADN masculino, talvez através de substituição das protaminas do ADN masculino por histonas, facilitando assim a combinação dos complementos de ADN feminino e masculino para formar o zigoto diplóide.

Assim, é preferível que o material genético exógeno seja adicionado ao complemento masculino do ADN ou a qualquer outro complemento de ADN antes de ser afectado pelo pronúcleo feminino. Por exemplo, o material genético exógeno é adicionado ao pronúcleo masculino inicial, o mais rapidamente possível após a formação do pronúcleo masculino, que é quando os pronúcleos masculino e feminino estão bem separados e se localizam ambos próximo da membrana celular. Alternativamente, o material genético exógeno pode ser adicionado ao núcleo do espermatozóide após ter sido induzido a sofrer descondensação. O espermatozóide contendo o material genético exógeno pode então ser adicionado ao óvulo ou o espermatozóide descondensado pode ser adicionado ao óvulo sendo o material genético exógeno adicionado o mais rapidamente possível depois disso.

Para os fins do presente invento um zigoto é essencialmente a formação de uma célula diplóide que é capaz de se desenvolver num organismo completo. Geralmente, o zigoto será constituído por um ovo contendo um núcleo formado, quer naturalmente quer artificialmente, pela fusão de dois núcleos haplóides a partir de um gameta ou gametas. Assim, os núcleos dos gametas devem ser aqueles que são naturalmente compatíveis, i.e., aqueles que resultam num

zigoto viável capaz de sofrer diferenciação e desenvolvimento num organismo em funcionamento. Geralmente, é preferido um zigoto euplóide. Se for obtido um zigoto aneuplóide, então o número de cromossomas não deve variar em mais do que um em relação ao número euplóide do organismo do qual cada um dos gametas é originário.

Além de considerações biológicas semelhantes, as físicas também regulam a quantidade de material genético exógeno que pode ser adicionado ao núcleo do zigoto ou ao material genético que forma uma parte do núcleo do zigoto. Se não for removido nenhum material genético, então a quantidade de material genético exógeno que pode ser adicionada é limitada pela quantidade que será absorvida sem ser fisicamente disruptiva. Geralmente, o volume de material genético exógeno inserido não excederá cerca de 10 picolitros. Os efeitos físicos da adição não devem ser tão grandes que destruam fisicamente a viabilidade do zigoto. O limite biológico do número e variedade de sequências de ADN variará dependendo do zigoto particular e das funções do material genético exógeno e será facilmente evidente para um perito na técnica, porque o material genético, incluindo o material genético exógeno, do zigoto resultante deve ser biologicamente capaz de iniciar e manter a diferenciação e o desenvolvimento do zigoto num organismo funcional.

O número de cópias das sequências de ADN que são adicionadas ao zigoto está dependente da quantidade total de material genético exógeno adicionado e será a quantidade que permite que a transformação genética ocorra. Teoricamente é apenas necessária uma cópia, no entanto, geralmente, são utilizadas numerosas cópias, por exemplo, 1000-20000 cópias de um gene, para assegurar que uma cópia é funcional. No que se refere ao presente invento, há geralmente uma vantagem em ter mais do que uma cópia funcional de cada uma das sequências de ADN exógenas inseridas para aumentar a expressão fenotípica das sequências de ADN exógenas.

Qualquer técnica que permita a adição do material genético exógeno ao material genético nucleico pode ser utilizada, desde que não seja destrutiva para a célula, membrana nuclear ou outras estruturas celulares ou genéticas

existentes. O material genético exógeno é de preferência inserido dentro do material genético nucleico através de microinjecção. A microinjecção de células e estruturas celulares é conhecida e é utilizada na técnica.

Assim, o presente invento proporciona métodos em que as sequências de ADN recombinantes clonadas codificando sequências direccionadoras para a membrana apropriadas podem ser injectadas em ovos de mamífero fertilizados (de preferência ovos de ratinho). Os ovos injectados são implantados em fêmeas pseudo-grávidas e são criados até termo para proporcionar ratinhos transgénicos cujas células expressam proteínas relacionadas com a patologia da doença relevante. As sequências injectadas são construídas possuindo sequências promotoras ligadas de modo a expressar a proteína desejada em tecidos específicos do mamífero transgénico (principalmente em tecido nervoso). Adequadamente, o vector é adaptado para expressão específica dos neurónios para produzir agregação semelhante a doença de Alzheimer tal como se sabe agora ocorrer no cérebro humano. Exemplos podem incluir o promotor específico de prião de Lewis *et al.* (2000) ou o promotor da enolase neuroespecífico de Thunecke *et al.* (2000).

Os animais não humanos do invento podem ser homozigóticos ou heterozigóticos para o polipéptido de fusão. Animais mamíferos incluem primatas não humanos, roedores, coelhos, ovelhas, gado, cabras, porcos. Roedores incluem ratinhos, ratos e cobaias. Especificamente proporcionados são:

- Métodos de preparação de um modelo animal transgénico com patologia aumentada ou acelerada para uma doença de agregação de proteínas e o animal transgénico criado através de tais métodos.

- Métodos de produção de uma geração F_1 através de cruzamento de um animal fundador de um dos sexos (geração F_0) com um animal que não seja transgénico em relação às proteínas aqui discutidas, e que seja de preferência de tipo selvagem). A descendência (geração F_1) pode então ser pesquisada e os que possuem um transgene resultando numa patologia aumentada para a doença, são seleccionados.

- Métodos de produção de uma geração F_2 através do cruzamento de 2 animais F_1 de sexo apropriado. A descendência (geração F_2) pode então ser pesquisada e os que possuem um transgene na dosagem apropriada (i.e., hetero ou homozigóticos) resultando numa patologia aumentada para a doença, são seleccionados.

- Um método de modulação do fenótipo da doença de um modelo animal transgénico, e o organismo transgénico com o fenótipo modulado, tal como descrito acima.

Os mamíferos não-humanos transgénicos do invento podem ser assim utilizados para fins experimentais no estudo de doenças semelhantes a Alzheimer, e no desenvolvimento de terapias desenhadas para aliviar os sintomas ou a progressão de tais condições. Por "experimental" entenda-se permissível para utilização em experimentação animal ou para fins de teste sob a legislação em vigor aplicável à instalação de investigação onde tal experimentação ocorre.

O animal pode ser utilizado para pesquisar ou testar potenciais agentes de diagnóstico, terapêuticos ou de prognóstico de agregação de proteínas semelhante a doença de Alzheimer (ver abaixo para mais discussão). Este aspecto do invento proporciona assim um modelo animal que pode ajudar na investigação da doença de Alzheimer e de condições semelhantes a doença de Alzheimer. No sistema modelo *in vivo*, a condição semelhante a doença de Alzheimer é induzida no animal causando ou permitindo que um agregado de proteínas semelhante a doença de Alzheimer localizado na membrana seja sintetizado nas células. Utilizando este sistema modelo, um composto suspeito de ter um efeito terapêutico em relação à doença de Alzheimer ou a uma condição semelhante a doença de Alzheimer pode ser administrado ao animal, e podem ser estudados quaisquer efeitos sobre a condição (p.ex. melhorias nos sintomas, ou qualquer outro indicador adequado). Em particular, os mamíferos transgénicos do presente invento são úteis na determinação da eficácia de drogas farmacêuticas em relação à sua capacidade para diminuir a quantidade de agregados que se formam no interior do cérebro do animal. Estes agregados podem ser medidos através de técnicas bioquímicas e/ou histológicas utilizadas em medições de DA em

humanos (ver, p.ex., Mukaetova-Ladinska, E.B. *et al.* (2000) *loc. cit.*).

De maior preferência a agregação (ou inibição desta) é avaliada através da produção (ou inibição ou abolição da produção) de fragmentos truncados de tau resultando de processamento proteolítico, p.ex. de tau inteira endógena. Em concretizações preferidas a agregação de tau é evidenciada através de processamento proteolítico num fragmento nuclear truncado correspondendo ao verificado no núcleo real de PHF de DA. No entanto, a produção de qualquer um ou mais outros fragmentos que sejam produtos de diagnóstico ou subprodutos deste processo pode também ser utilizada.

Os mamíferos são assim úteis em testes de eficácia de tais fármacos, no contexto farmacocinético, em prevenção da formação ou redução da quantidade de agregação formada bem como da eliminação ou redução de agregação já formada.

Em termos gerais, um fármaco a testar é administrado a um animal de controlo ou grupo de animais que não sejam os animais transgénicos do invento e simultaneamente a animais transgénicos do invento. O fármaco é de preferência administrado continuamente ao longo de um período de tempo que é normalmente suficiente para efectuar a formação de agregados no cérebro do animal. Após a administração do fármaco durante um período de tempo suficiente o animal ou animais de controlo, juntamente com o animal ou animais transgénicos, são sacrificados. O exame do cérebro dos animais é feito tal como descrito acima.

Num tal sistema, o efeito de um potencial inibidor ou modulador da agregação de proteínas pode ser determinado ou detectado tal como descrito acima, p.ex. através de imunoensaio, por exemplo para observar a inibição da formação de tau, ou agregados semelhantes a tau tal como os detectados em tecido cerebral humano através dos métodos de, p.ex., Wischik *et al.* (1995; *loc. cit.*), Lai *et al.* (1995; *loc. cit.*), ou Mukaetova (2000; *loc. cit.*), em que a medição das formas agregadas de proteína tau é realizada em tecidos cerebrais.

Por exemplo, a produção de agregados nas células pode ser visualizada histologicamente e através de microscopia electrónica, e a prevenção destes agregados avaliada de forma semelhante.

Comparando a quantidade de depósito de agregado dentro do animal ou animais de controlo com a quantidade de depósito dentro do mamífero ou mamíferos transgénicos do invento pode ser feita uma determinação em relação à eficácia do fármaco. Protocolos de teste de fármacos comparativos conhecidos dos peritos na técnica podem ser utilizados em conjunto com os mamíferos transgénicos do invento para testar fármacos. A concentração intracelular final do fármaco pode ser seleccionada para ser apropriada para a proteína de doença exacta e o fármaco em questão, mas pode estar num intervalo que será finalmente apropriado para utilização clínica em termos de toxicidade, tomada, etc. (p.ex., 1 M - 1 mM, de preferência 4-600 M).

O ensaio de pesquisa *in vivo* do invento não necessita de medir directamente o grau de inibição, ou de modulação, da agregação de proteínas semelhante a doença de Alzheimer causada pelo composto a testar. Em vez disso pode ser medido o efeito a jusante sobre a própria condição patológica, p.ex. doença de Alzheimer. Por exemplo, antecipar-se-ia a existência de efeitos comportamentais nos animais, tais como defeitos de movimento, potência ou tónus, reflexos anormais, evidência de deficiente memória ou resposta a estímulos ambientais.

Por os animais transgénicos do invento poderem ser utilizados para testar a eficácia de fármacos em relação à prevenção de agregação de proteínas associada a doença, os animais são ferramentas de pesquisa valiosas no que diz respeito a permitir que os investigadores testem a eficácia de tais fármacos no tratamento de doenças tais como doença de Alzheimer. Se preferido, em todos os casos, o ensaio do animal transgénico pode ser executado em paralelo com, ou subsequente a, um ensaio *in vitro* ou baseado em células, p.ex. de acordo com aspectos anteriores do presente invento, para confirmar que qualquer efeito sobre a condição em si é

um resultado da inibição da agregação de proteínas semelhante a doença de Alzheimer e não apenas um efeito tóxico geral.

Assim, tal como descrito em detalhe acima, o presente invento refere-se *inter alia* à utilização de uma molécula de ácido nucleico, polipéptido ou derivado deste, uma célula hospedeira, um animal transgénico ou um sistema modelo localizado na membrana *in vitro*, todos tal como aqui proporcionados, em métodos de pesquisa de substâncias de teste possuindo um efeito inibidor ou modulador sobre a agregação de proteínas semelhante a doença de Alzheimer. Noutros aspectos, o presente invento estende-se a compostos inibidores ou moduladores obteníveis utilizando um método de pesquisa de um aspecto anterior.

Vários outros aspectos e concretizações do presente invento serão aparentes aos peritos na técnica tendo em vista a presente descrição. Certos aspectos e concretizações do invento serão agora ilustrados apenas para fins de exemplo, e com referência às seguintes Figuras e Exemplos.

Figuras

A Figura 1 mostra uma ilustração esquemática de um ensaio de acordo com o invento, tal como descrito no Exemplo 1 (baseado em células) e no Exemplo 3 (modelo animal).

(A) (1:) Ensaio baseado em expressão constitutiva da sequência direccionada à membrana sozinha, neste caso uma Sequência Sinal mais tau truncada (SStau190-441). As moléculas associadas à membrana combinam-se conduzindo à formação de um fragmento de 25 kDa. Tal como mostrado na Figura 17(a) o fragmento de 25 kDa contém imuno-reactividade associada ao domínio de repetição e ao terminal C, mas não a um epitopo localizado entre os resíduos 208-238. O comprimento do fragmento é 175 resíduos e o provável local de clivagem N-terminal é no resíduo 266, o terminal N de fase mudada da primeira repetição verificada na proteína tau isolada do núcleo de PHF.

(A) (2:) Ensaio baseado na segunda proteína (T40 - tau inteira), cuja clivagem proteolítica é "semeada" pela

presença de níveis baixos de fundo de SStau190-441 que é direccionada para o retículo endoplasmático através da sequência sinal. T40 induzida por IPTG é ligada à espécie SStau190-441 na membrana ou após libertação do agregado derivado de SStau190-441 para o citosol. Esta T40 capturada é agora ainda processada primeiro para dar origem a maiores níveis de uma espécie com mobilidade em gel e imunorreactividade idênticas à da espécie derivada de SStau190-441. É então ainda processada através da mesma via para gerar maiores níveis do produto de degradação de 25 kDa. Inibidores de agregação de tau bloqueiam a produção derivada de T40 do fragmento de 25 kDa na presença de IPTG.

(B) Ensaio baseado no segundo padrão de clivagem de SStau190-441. Neste caso, as moléculas associadas à membrana combinam-se de modo ligeiramente diferente através da região de repetição para dar origem a outros três produtos de truncagem (ver na Figura 17 (a)) com mobilidades em gel de 30 kDa (200 resíduos), 18 kDa (125 resíduos) e 12/14 kDa (95 resíduos).

(C) Ensaio baseado na expressão constitutiva e agregação de SStau190-390. Neste caso, o processamento proteolítico dá origem a uma única espécie predominante com mobilidade em gel de 18 kDa (125 resíduos). Isto surge através da agregação de moléculas SStau190-390 através do domínio de repetição, dando origem a um fragmento proteoliticamente protegido derivado inteiramente do domínio de repetição (i.e., 266 - 390). Numa variante do padrão de ligação do domínio de repetição, ilustrada na Figura 17 (b), uma espécie ligeiramente diferente de 18 kDa poderia surgir através da associação de SStau190-390 com níveis de fundo baixos de T40, para dar origem a um fragmento equivalente a 4 repetições de comprimento (i.e., 125 resíduos), mas estendendo-se no equivalente de 1 repetição para além de 390 dentro da cauda C-terminal da molécula (i.e. 295 - 422). Num esquema diferente ilustrado na Figura 16d, pequenas quantidades de um fragmento consistindo em apenas 3 repetições (i.e., 95 resíduos) são capazes de formar formas diméricas minoritárias com mobilidade em gel atípica correspondendo a 19/22 kD.

(D) Ensaio baseado na expressão constitutiva de SStau296-390 na presença de T40 de fundo. Neste caso, são formadas duas espécies predominantes, uma de 12/14 kDa correspondente ao próprio fragmento SStau296-390, e uma outra espécie com mobilidade em gel de 18 kDa. A última não pode ser um produto de degradação de SStau296-390. É também improvável que seja uma forma principal do dímero (ver Figura 16d), que tem uma mobilidade em gel predominante correspondendo a 24 kDa. Portanto, é muito provável que a de 18 kDa ocorra através de truncagem de T40 que foi capturada através de um agregado SStau296-390. Esta espécie corresponde novamente ao equivalente a 4 repetições (i.e., 125 resíduos), e pode surgir através de duas possíveis interacções de ligação entre T40 e o agregado de SStau296-390, tal como mostrado. Neste modelo o passo limitante de velocidade para a formação da espécie de 18 kDa a partir de T40 pode ser determinado através da quantidade de tau truncada que se agrega no sistema.

(E) Ensaio baseado na expressão constitutiva de SSttau296-390 no cérebro do ratinho transgénico. Tal como no sistema descrito em (D), o produto predominante não é a própria SStau296-390, mas uma espécie de maior peso molecular de 18 kD. Pelas razões discutidas acima, é improvável que seja um dímero ou um produto de degradação da espécie SStau296-390 introduzida de forma transgénica no animal. Pelo contrário, é mais provável que surja através da captura e processamento proteolítico de tau endógena de ratinho. Neste caso, sabe-se que o cérebro de ratinho expressa apenas a isoforma de 3 repetições. É muito provável que o fragmento de 18 kD gerado neste caso seja a forma com a extensão C-terminal dando origem a uma espécie equivalente de 4 repetições de comprimento (125 resíduos, ou o fragmento entre os resíduos 266 e 422 na isoforma de 3 repetições). No entanto, um padrão de ligação ligeiramente diferente é também possível, em que a extensão é no terminal N (i.e. o fragmento de entre os resíduos 235 e 390 na isoforma de 3 repetições).

Figura 2. As actividades inibidoras de tionina, clorpromazina e tacrina foram comparadas no modelo celular direccionado à membrana (produção da espécie de 25 kDa). Há

uma clara distinção entre compostos activos e inactivos (ver Exemplo 2).

Figura 3. Os dados da Figura 2 foram analisados em maior detalhe matematicamente utilizando um modelo inibidor padrão, e um procedimento numérico (método de Gauss-Newton) para resolver a KI. Os dados podem ser muito aproximados, assumindo um valor de K_d para a ligação tau-tau dentro da célula de 500 nM, e um valor de KI correspondente de 33 nM. A significância destes valores pode ser compreendida através da comparação com o que é conhecido da influência da fosforilação na ligação tau-tau *in vitro* (ver Wischik, C.M., *et al.* (1997) *loc. cit.*).

A Figura 4 (a) mostra uma ilustração esquemática da estrutura de um filamento helicoidal emparelhado (cima) e da imunquímica de emaranhados neurofibrilares durante a progressão da doença de Alzheimer (baixo). A Figura 4 (b) mostra uma ilustração esquemática dos locais de ligação de vários anticorpos monoclonais a diferentes formas de tau truncada em N e C.

A Figura 5 (a) mostra as sequências de nucleótidos e de aminoácidos previstas de uma isoforma da proteína tau humana. A sequência foi deduzida a partir do clone de ADNc httau40. A Figura 5 (b) mostra as sequências de algumas das construções do presente invento.

A Figura 6 (a) mostra construções utilizadas para microinjecção para preparar ratinhos transgénicos. Estas são (i) Thyl-sstau296-390, e (ii) Thyl-sstau186-441. A Figura 6 (b) mostra a construção Thyl-SSTau296-390 em maior detalhe. Esta foi clonada no vector de expressão Thy-1 e foi então microinjectada em oócitos fertilizados de ratinhos NMRI utilizando métodos de: "Manipulating the mouse embryo", um manual de laboratório, segunda edição, Cold Spring Harbour Press, CSH, N.Y. Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., Lacy, E., editores, 1994).

A Figura 7 mostra uma representação esquemática de tau, MAP2 (forma adulta), MAP2C (forma juvenil) e tau de elevado peso molecular (verificada no PNS e nas linhas celulares de

neuroblastoma). Estas proteínas partilham domínios de ligação a microtúbulos semelhantes, mas diferem substancialmente na sequência e extensão do domínio de projecção N-terminal. As formas juvenis de tau e MAP2 têm apenas 3 das repetições em cadeia. Uma forma de 4 repetições de MAP2 também existe.

A Figura 8 mostra diferenças na sequência na região de repetições em cadeia da tau humana (linha superior) e MAP2 humana (linha inferior). As setas verticais mostram os limites do fragmento nuclear de PHF truncado terminando em Glu-391, e os segmentos de ligação a tubulina são mostrados sublinhados.

A Figura 9 mostra uma construção de acordo com uma concretização do presente invento. (a) A sequência sinal da albumina de rato foi inserida em frente do codão de iniciação do ADNc codificando globina de coelho para alcançar o direccionamento para a membrana do ARNm da globina. A Figura 9(b) mostra que um fragmento do ADNc da tau humana codificando os aminoácidos 190-441 foi inserido para substituir parte da sequência de globina, para realizar a expressão de um fragmento de tau com uma sequência sinal N-terminal. As 5' e 3' UTR foram mantidas na construção.

A Figura 10 mostra um resumo dos fragmentos de tau do presente invento que foram expressos em células hospedeiras. Três fragmentos de tau, contendo todos o domínio de agregação nuclear, foram expressos com sequências sinal N-terminais. Para comparação, as formas solúveis de dois dos fragmentos foram também expressas, bem como a tau inteira.

A Figura 11 mostra a localização de SStau190-390 após transfecção estável de células 3T6. As células 3T6 isoladas como clones estáveis após transfecção com um ADNc codificando os aminoácidos 190-390 da maior isoforma da tau humana ligado a uma sequência sinal N-terminal, foram incubadas com butirato de sódio 5 mM durante 20 h para aumentar a expressão proteica, fixadas com paraformaldeído e marcadas com mAb 7.51 dirigido contra o domínio de repetição da tau. Estas células mostram uma morfologia de tau semelhante à das células expressando SStau190-441, mas as células isoladas após a transfecção estável com SStau190-390 mostraram

consistentemente níveis mais elevados de expressão do fragmento de tau, com uma proporção mais elevada mostrando grandes agregados de tau (ver Exemplo 1).

A Figura 12 mostra uma análise de *Northern blot* de tipo selvagem ("Wt") e ARN da linha transgênica de ratinho 1 ("1") com uma sonda específica mostrando um nível de expressão elevado de ARN transgênico na linha transgênica de ratinho 1. O controlo S26 mostra as mesmas quantidades de carga (ver Exemplo 3).

A Figura 13 mostra a purificação da SStau290-391 através de imunoprecipitação utilizando mAb 7.51. 0,1 g de cérebro de ratinho foram homogeneizados utilizando 500 μ l de tampão de lise (NaCl 150 mM, SDS a 0,01%, NP40 a 0,1%, Tris 50 mM, 100 g/ml de PMSF, DTT 1 mM, 1 g/ml de Leupeptina). A suspensão foi então sujeita a ultra-sons em gelo durante 1 min e centrifugada com uma centrífuga de bancada (Eppendorf) a 14000 rpm durante 4 min. Isto leva à fracção de sobrenadante "S1". A primeira imunoprecipitação foi realizada utilizando mAb 342 para esgotar a preparação de tau de ratinho endógena. A fracção S1 foi incubada com 1/10 do volume de anticorpo 342 (1:10), incubada durante 2 h a 4°C com agitação, depois foram adicionados 100 μ l de contas de Proteína A-Sepharose (10% v/v em tampão de lise), incubou-se durante 1 h a 4°C, centrifugou-se numa centrífuga de bancada a 14000 rpm durante 30 seg. O sobrenadante foi tomado para mais imunoprecipitação utilizando mAb 7.51. Foi adicionado 1/10 v/v de 7.51, incubou-se durante 2 h a 4°C com agitação. Foram adicionados 40 μ l de contas de Proteína A-Sepharose, incubou-se durante 1 h a 4°C, centrifugou-se durante 15 seg a 14000 rpm, lavou-se 3 vezes com o tampão de lise acima mencionado. Depois, foram adicionados 30 μ l de tampão de amostras Laemmli, aqueceu-se a 85°C durante 5 min, centrifugou-se durante 30 seg. O sobrenadante foi então carregado em gel de SDS-PAGE a 15%. As pistas IP751 indicam uma diferença a 12-14 kDa correspondendo à presença do produto proteína SStau290-391 num animal transgênico da linha 1. O fundo escuro a peso molecular mais elevado é devido à presença de imunoglobulinas de ratinho endógenas detectadas no decurso do desenvolvimento do *immunoblot* (ver Exemplo 3).

A Figura 14 mostra a fracção S1 preparada em tampão de lise, tal como indicado acima, sem imunoprecipitação. O *immunoblotting* utilizando mAb 7.51 revelou além da banda de 12-14 kDa correspondente ao transgene, uma nova espécie mais proeminente com mobilidade em gel de 18 kDa. Isto foi observado em todos os indivíduos da linha 1 em vários graus, de acordo com a idade do animal até aos 15 meses. São mostradas idades de 5 meses, 4 meses e 4 meses, respectivamente. O mapeamento do epitopo (não mostrado) demonstrou que a espécie de 18 kDa foi reconhecida pelo mAb 7.51 (epitopo no domínio de repetição) e um anti-soro policlonal K9JA ("DAKO A/S", reconhecendo também os epitopos localizados no domínio de repetição de tau). A espécie de 18 kDa não foi reconhecida pelo anti-soro policlonal do terminal C T46.1 ou mAb 342, que reconhece um epitopo localizado entre os resíduos 208-238. A espécie de 18 kDa não pode surgir como uma degradação de produto do produto do transgene, nem pode surgir como um dímero de SStau296-390. É portanto provável que a espécie de 18 kDa seja gerada através do processamento proteolítico dependente de agregação de tau de cérebro de ratinho endógena tal como mostrado na Figura 1.

A Figura 15 mostra electroforese em gel bidimensional (2DE), coloração de prata e *immunoblotting*. 500 mg de cérebro de ratinho foram homogeneizados em 2 ml de tampão de lise (ver acima), sujeitos a ultra-sons em gelo, centrifugados a 14000 rpm. A fracção S1 foi tomada e fervida durante 5 min a 95°C, centrifugada a 14000 rpm durante 5 min, o sobrenadante foi tomado e concentrado 10 vezes utilizando um centricon3000. 20% desta suspensão de proteína foram carregados num gel 2-DE. 1ª dimensão focagem isoeléctrica, 2ª dimensão SDS-PAGE a 15%. Os géis foram corados com prata e os géis foram corridos em paralelo sob as mesmas condições e transferidos, depois incubou-se com anticorpo 7.51 (ver acima). As setas pretas mostram o produto do gene de 12-14 kDa e um duplete correspondente à espécie de 18 kDa. Além disso, existe um esfregaço ainda não caracterizado de menor mobilidade em gel que também distinguiu o animal transgénico do tipo selvagem. É provável que este esfregaço contenha vários produtos tau de peso molecular mais elevado também derivados de tau de ratinho endógena. Outras manchas imunorreactivas para tau de peso molecular mais elevado

isoladas são também observadas variavelmente, dependendo do protocolo preparativo utilizado (ver Exemplo 3).

A Figura 16 mostra os resultados obtidos com as várias linhas celulares do Exemplo 1.

A Figura 16 (a) mostra uma análise de células expressando fragmentos de tau através de *immunoblotting*. As células expressando estavelmente fragmentos de tau e expressando também tau inteira sob o controlo de um promotor indutível com IPTG, foram incubadas com IPTG 5 mM ou butirato de sódio 5 mM durante 24 h antes da análise em géis de SDS a 15% seguido de *immunoblotting* com o mAb 7.51, que se liga a um epitopo no domínio de repetição de tau. A proteína SStau190-441 tem um RMM aparente de 40 K nos géis, e é degradada num fragmento de 25K. Em contraste, o fragmento tau186-441 solúvel e T40 solúvel mostram diferentes perfis de degradação. A indução de tau inteira (I) em células expressando SStau190-441 causa maior surgimento das proteínas de 40K e 25K, e possivelmente uma pequena quantidade de um fragmento de 30K. O aumento da expressão da proteína transfectada através da adição de butirato de sódio (B) aumenta também a quantidade de ambos os fragmentos, e induz o surgimento do fragmento de 30K.

Na Figura 16 (b) a proteína SStau190-390 tem uma RMM aparente de 30K, com uma pequena quantidade de um produto de degradação a 18K. A indução de tau inteira causa um ligeiro aumento na quantidade de proteína de 30K. O tratamento com butirato provoca um maior aumento na quantidade do fragmento de 30K, e aumenta também a quantidade do fragmento de 18 kDa. Este padrão de degradação não é observado para o fragmento 186-391 solúvel ou a T40 inteira.

A Figura 16 (c) mostra uma análise de células expressando fragmentos de tau através de *immunoblotting*. Células expressando estavelmente o fragmento de tau SStau296-390 e também expressando tau inteira sob o controlo de um promotor indutível por IPTG, foram incubadas com IPTG 5 mM ("I") ou butirato de sódio 5 mM ("B") durante 24 h antes da análise em géis de SDS a 15% seguido de *immunoblotting* com mAb 7,51, que se liga a um epitopo no domínio de repetição de

tau. A pista não marcada mostra apenas uma banda menor com mobilidade em gel correspondente a 18 kDa. A pista designada "B" mostra uma banda no gel proeminente com mobilidade correspondente a 18 kDa e uma banda menor que corresponde a 14 kDa. A pista designada "I" mostra uma banda menor com uma mobilidade em gel correspondente a 18 kDa. A derivação da banda de 18 kDa neste sistema de células é explicada na Figura 1(d). Uma vez que o fragmento de tau SStau296-390 tem uma mobilidade em gel de 14 kDa, a espécie de 18 kDa não pode surgir como um produto de degradação do fragmento de tau introduzido, nem há evidência de formação do dímero de 24 kDa observado p.ex. na Figura 16 (d).

A Figura 16 (d) mostra como o fragmento de tau dGAE (resíduos 297-391), expresso *in vitro* bacterianamente se agrega espontaneamente para formar uma série de oligômeros de ordem superior, dos quais a forma principal tem uma mobilidade em gel de 24 kDa. Existem oligômeros atípicos menores com mobilidade em gel de 19/22 kDa, que são muito provavelmente formas parcialmente degradadas do dímero.

Na Figura 16(e) o painel esquerdo replica o efeito mostrado em (a), em que IPTG dá origem a níveis aumentados de proteínas de 25K, 30K e 40K, para comparação. A mesma experiência realizada na presença de tionina bloqueia a produção da proteína de 25K, e reduz também a produção da proteína de 30K. A tionina, no entanto, não reduz os níveis detectados das bandas de 25K e 30K observadas com butirato. Portanto é mostrado que a tionina bloqueia a captura e o processamento da tau inteira que dá origem à banda de 25K.

A Figura 17 (a) mostra o processamento proteolítico de SStau190-441. As células expressando SStau190-441 e induzidas a expressar tau inteira através de tratamento com IPTG (pista da direita) foram analisadas com quatro anticorpos reconhecendo os epitopos localizados ao longo do comprimento da tau. O gel mostra a análise utilizando mAb 7.51, que reconhece o domínio de repetição da tau, revela todos os fragmentos de tau que contêm o domínio de agregação nuclear. As colunas restantes mostram um resumo da reactividade dos fragmentos positivos para o mAb 7.51 com três outros anticorpos. Os resultados são também mostrados numa

representação esquemática dos fragmentos produzidos através de processamento de tau inteira e de SStau190-441. Apenas a tau inteira é reconhecida por todos os quatro anticorpos. Um fragmento ligeiramente maior que o SStau190-441 é produzido através de truncagem N-terminal da tau inteira. Dois fragmentos menores do que SStau190-441 são produzidos através de processamento N-terminal ou C-terminal. Os dois fragmentos mais pequenos apenas reagem com o anticorpo no domínio nuclear, demonstrando estabilidade proteolítica deste domínio. A Figura 17 (b) mostra o processamento proteolítico de SStau190-390. Células expressando SStau190-390 e tratadas com butirato de sódio (pista da direita) produzem SStau190-390 e um único produto proteolítico de 18 kD. Tal como mostrado na tabela e esquematicamente à direita, a espécie de 18 kDa é imunorreactiva apenas com mAb 7.51. Os limites prováveis do fragmento são mostrados, à direita, com as razões indicadas descritas na Figura 1.

A Figura 18 mostra a sedimentação dos agregados de tau a partir de extractos celulares. Células expressando (a) SStau190-441 ou (b) SStau190-390, e induzidas a expressar tau inteira, foram homogeneizadas e centrifugadas a 720 g durante 3 min para produzir um sobrenadante pós-nuclear (pns). O pns foi centrifugado a 12000 g durante 2 min para sedimentar as membranas e agregados grandes, e o sobrenadante desta centrifugação foi centrifugado a 200000 g durante 22 min. A mesma análise foi realizada em pns que tinha sido tratado com Triton X-100 a 0,1% para solubilizar as proteínas membranares. A comparação dos sobrenadantes de 12K sem e com detergente (pistas 3, 7) mostra que está presente mais proteína no sobrenadante após extracção com detergente. Em ambos os casos, uma quantidade significativa de proteína surge também no sedimento (pistas 4, 8). A centrifugação dos sobrenadantes de 12K a 200 Kg sedimenta a proteína restante (pistas 6, 10).

A Figura 19 (a) mostra um esquema conceptual em que factores críticos de nucleação proporcionam uma "semente" que inicia a captura de tau, que se torna então autocatalítica. A Figura 19 (b) mostra um putativo modelo patogénico da doença de Alzheimer. A agregação de tau é um processo proximal antes da falha do transporte axonal e consequente morte neuronal. A

cascata de agregação de tau pode ser desencadeada quer através de um evento de sementeira/nucleação surgindo de alterações a montante ou a partir de mutações primárias no gene de tau.

A Figura 20 mostra uma tabela listando proteínas que têm um papel em doenças de agregação de proteínas. Também estão listadas as próprias doenças, o domínio de agregação e/ou a mutação que se crê estar envolvida, e o putativo tamanho (máximo) da subunidade das fibrilhas. É dada uma ou mais referências da literatura para cada proteína.

Figura 21. Análise de sequência de proteínas na preparação de PHF nuclear, após remoção de PHF-tau solúvel em ácido. O resíduo foi solubilizado de acordo com o protocolo de fibrilhas de paraplexia enzoótica de Stahl *et al.* (1990, *Biochemistry* 29: 8879-8884). Os rendimentos são dados para uma preparação típica de um único cérebro de DA. Os fragmentos de proteína e os resíduos correspondentes identificados como co-purificando com a proteína tau de PHF nuclear em bandas de mobilidade em gel aparente são mostrados em kDa. As proteínas não-tau co-purificando na forma de complexos resistentes a SDS e electroforese são: ubiquitina, porina e proteína nuclear 2 do complexo mitocondrial III ("núcleo-2"). A subunidade de ATP-sintetase 9 ("ATP-9") foi verificada numa forma que co-purificou com a proteína A das placas. As sequências de porina foram também identificadas a partir de digestões Asp-N* e CNBr** da espécie de 34 kDa.

Exemplos

Exemplo 1 - produção de proteína ligada à membrana

Introdução

Um ARNm para uma proteína que é normalmente traduzida em ribossomas livres pode ser direccionado a ribossomas ligados à membrana através da inclusão de uma sequência sinal (SS) de uma proteína segregada; a natureza da 3'UTR também influencia a eficiência do direccionamento (Partridge, K.A., *et al.* (1999) *Cytotechnology* 30, 37-47). Uma proteína que é normalmente solúvel pode portanto tornar-se inserida na

membrana do retículo endoplasmático. Os presentes inventores utilizaram esta abordagem para construir uma forma associada à membrana da tau que cria a concentração localizada de tau necessária para promover agregação.

As linhas celulares expressando estavelmente estas formas de tau associadas à membrana mostram evidência de agregação e processamento proteolítico de tau pelos critérios de histologia, sedimentação de formas insolúveis de proteína tau a partir de extractos celulares e análise dos produtos proteolíticas através de *immunoblotting*.

Perspectiva geral do sistema de expressão

O sistema de expressão utilizado para a produção de fragmentos de tau associados à membrana está resumido na Figura 9. O sistema baseia-se na observação de que o ARNm de globina de coelho é traduzido em ribossomas ligados à membrana se a sequência sinal de albumina de rato for inserida na extremidade 5' do ADNc (Partridge, KA, et al., *loc. cit.*). O vector anteriormente descrito para expressão de globina (Figura 9a) foi modificado para incorporar fragmentos da sequência de tau a jusante da sequência sinal, enquanto mantém ao mesmo tempo a 3'UTR da globina (Figura 9b).

Três mutantes de truncagem de tau (aminoácidos 296-390, 190-441 e 190-390), referidos como SStau296-390, SStau190-441 e SStau190-390, respectivamente, foram expressos utilizando este sistema. As estruturas destes mutantes, em conjunto com tau inteira e os equivalentes fragmentos de tau solúveis utilizados como controlos, estão resumidos nas Figuras 5 e 10. As proteínas foram expressas constitutivamente em células 3T6 que expressam também a sequência de tau inteira sob o controlo de um promotor indutível por IPTG.

Construção das construções SStau

pCKSSGG tal como mostrado na Figura 9a e descrito por Partridge et al. (1999) *loc. cit.*

Mutagénesse baseada em PCR em pcKSSGG para introduzir um local AgeI no codão de iniciação da globina para produzir pcKSSGGAgeI.

iniciador directo: 5'-gcctttttcaccggtgcatctgtcca-3'

iniciador inverso: 5'-tggacagatgcaccggtgaaaaggc-3'

ADNc de htau40 (ver Goedert *et al.*, 1989 Neurone 3: 519-526).

pcKSStau190-441

Mutagénesse baseada em PCR em htau40 para introduzir um local AgeI no nucleótido 1128 de htau40 (aminoácido 186). O fragmento cortado com EcoRI (corta a sequência de tau além do codão de terminação), tornado de extremidades cegas, depois com AgeI, ligado em pcKSSGGAgeI cortado com BamHI, tornado de extremidades cegas, depois AgeI para produzir pcKSStau190-441. A ligação destrói a sequência de tau entre os aminoácidos 186-189, de modo a que o aminoácido 190 seja o início da sequência de tau.

iniciador directo: 5'-tctggtgaaccggtaaaatacgggg-3'

iniciador inverso: 5'-ccccgtattttaccggaacaccaga-3'

pcKSStau190-390

Mutagénesse baseada em PCR em pcKSStau190-441 para introduzir um local BamHI e o codão de terminação no nucleótido 1740 (termina a sequência de tau no aminoácido 390). Fragmento cortado com AgeI e BamHI e ligado em pcKSSGGAgeI nos mesmos locais para produzir pcKSStau190-390.

iniciador directo: 5'-cttgtactcgagctacgccccgtgg-3'

iniciador inverso: 5'-cggggcgtaggataagtacaagtcg-3'

pcKSStau296-390

Mutagénesse baseada em PCR em pcKSStau190-390 para introduzir um local AgeI no nucleótido 1450 (aminoácido 293) de pcKSStau190-390. Corte do fragmento com AgeI e BamHI e

ligado em pcKSSGGAgeI nos mesmo locais para produzir pcKSStau290-390.

iniciador directo: 5'-ggctcaccggttaatatcaaac-3'

iniciador inverso: 5'-gtttgatattaaccggtgagcc-3'

Estas construções estão no vector de expressão pcADN3.1, que contém o marcador de resistência a G418. Todos foram subclonados no vector pcADN3.1zeo, que contém o marcador de resistência a zeocina, para transfecção na linha celular indutível de T40.

Construção da construção indutível de T40

Isto foi baseado no sistema de Stratagene (Nº. de Catálogo 217450), em que um vector p3'SS (constitutivamente expressando o gene *lacI*, e seleccionado para utilização de higromicina) é utilizado em conjunto com pOPRSVICAT (que inclui o promotor forte de RSV com sequências de operador a partir do operão *Lac*, e é seleccionado com neomicina). Resumidamente, os dois vectores são incorporados em células, tais como fibroblastos 3T3 ou 3T6. A repressão do operão por *lacI* é aliviada pela adição de IPTG. Para preparar a construção de T40, o fragmento da proteína tau foi clonado no vector pOPRSVICAT (que contém um local NotI) de acordo com as instruções do fabricante.

Resultados

As células foram analisadas através de imunofluorescência utilizando um anticorpo dirigido contra o domínio de agregação nuclear, mAb 7.51 (Novak, M., et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 88: 5837-5841). Para fins de controlo, células 3T3 estavelmente transfectadas expressando o fragmento solúvel de tau 186-441, foram fixadas com duas condições de fixação diferentes (a) paraformaldeído ou (b) glutaraldeído e Triton X-100 e marcadas com mAb 7.51 dirigido contra o domínio de repetição de tau. Após fixação com paraformaldeído, a marcação para tau foi difusa ao longo do citoplasma (como anteriormente relatado por Schliwa et al., 1981, *PNAS USA* 78: 1037-1041), enquanto que as células fixadas com glutaraldeído e Triton X-100 mostram marcação da

tau ao longo dos microtúbulos. Este padrão de marcação foi típico para os fragmentos solúveis de tau; provas da agregação de tau não são, no entanto, observadas.

Células 3T6 transfectadas estavelmente e expressando o domínio de agregação mínimo direccionado à membrana, SStau296-390, foram incubadas com butirato de sódio 5 mM durante 20 h para aumentar a expressão proteica e fixadas em paraformaldeído. Estas tornaram-se marcadas através do mAb 7.51 ao longo do citoplasma num padrão reticular consistente com a associação ao retículo endoplasmático (não mostrado). No entanto, esta proteína foi apenas expressa a níveis detectáveis numa pequena proporção das células e a agregação da proteína foi raramente observada.

Em contraste, a marcação de células estavelmente transfectadas com, e expressando, SStau190-441 ou SStau190-390 revela grandes agregados, alguns dos quais têm uma aparência linear. Estes agregados estavam frequentemente agrupados na área perinuclear, e por vezes têm uma forma filamentosa (Figura 11).

A proporção de células expressando estes agregados é aumentada através da adição de butirato de sódio, que aumenta o nível de expressão da proteína (Gorman, C.M., et al. (1983) *Nuc. Acids Res.* 11: 7631-7648; Kruh, J. (1982) *Mol. Cell. Biochem.* 42: 65-82), mas podem também ser verificados agregados em células expressando a proteína constitutivamente.

Células estavelmente transfectadas com, e expressando, SStau190-390 foram também fixadas em glutaraldeído na presença de Triton X-100 a 0,2% antes da marcação com 7,51. Este protocolo de fixação permite a visualização de proteína tau ligada aos microtúbulos, mas são também observados agregados de tau, demonstrando que são estáveis à extracção com detergente i.e. a sua estabilidade *per se* não é dependente da associação à membrana (não mostrado).

As proteínas expressas nestas linhas celulares foram analisadas através de *immunoblotting* com mAb 7.51, e o efeito da indução de tau e o tratamento com butirato examinados, em

comparação com linhas celulares expressando tau inteira e fragmentos solúveis de tau.

A proteína SStau190-441 analisada através de *immunoblotting* com o mAb 7.51 tem uma RMM aparente de 40K e mostra um produto de degradação característico a 25K, e um produto menos proeminente a 30K. O nível de expressão da proteína pode ser aumentado através de tratamento com butirato de sódio, o que aumenta a quantidade de todos os três produtos (Figura 16). O butirato induz também ocasionalmente o surgimento de dois produtos menores a 18 e 14K (ver Figura 17).

A indução de proteína tau inteira na presença de SStau190-491 aumenta a quantidade de produtos a 30K e 25K, mas não há surgimento de produtos menores (Figura 16a).

Assim, considerando a Figura 16a, quando os efeitos da indução por butirato e por IPTG são comparados, observa-se que o butirato actua não especificamente ao aumentar a produção de produtos de genes incorporados expressos constitutivamente (através de um mecanismo que não está bem compreendido). Isto serve como um controlo para a indução de IPTG, que induz especificamente apenas tau inteira. No primeiro painel, são comparados os efeitos na expressão do fragmento 186-441 não direccionado à membrana após tratamento com butirato ou IPTG. O butirato ("B") produz mais do fragmento 186-441 e um presumível produto de truncagem intimamente relacionado, mas IPTG ("I") não.

No terceiro painel, as mesmas condições são examinadas em células expressando simplesmente T40 indutível sob controlo por IPTG tal como descrito anteriormente. Aqui, apenas IPTG ("I") produz maiores níveis de T40, e produtos de degradação espontânea de aprox. 45 kDa. O butirato não tem efeito.

O painel do meio mostra o efeito de ambos os métodos de indução em células que expressam tanto SS190-441 constitutivamente como T40 sob um promotor indutível por IPTG. Sem indução, existem níveis baixos de T40 e as bandas características de 40 kDa e 25 kDa derivadas de SS190-441. O

butirato ("B") induz um nível mais elevado das bandas de 40, 30 kDa e 25 kDa. A indução de T40 por IPTG ("I"), que não tem efeito sobre a expressão constitutiva da banda de 40 kDa, gera níveis mais elevados, tanto da espécie de 40 kDa como de 25 kDa através de um mecanismo dependente de agregação (ver Figura 1). Portanto, a T40 induzida é processada através da via de 40 kDa para dar origem ao produto de truncagem de 25 kDa, desde que existam baixos níveis pré-existentes de SS190-441.

Considerando a Figura 16b, a proteína SStau190-390 analisada através de *immunoblotting* com o mAb 7.51 tem uma RMM aparente de 30K e mostra um produto de degradação a 18K, que corresponde aproximadamente ao tamanho do domínio de agregação mínimo de PHF. O nível de expressão da proteína e o seu produto de degradação característico de 18 kDa é substancialmente aumentado através de tratamento com butirato de sódio. Novamente, o fragmento de tau solúvel equivalente não é degradado do mesmo modo e não causa a produção do produto de degradação de 18 kDa i.e. a indução da proteína tau inteira na presença de SStau190-390 aumenta ligeiramente a quantidade de proteína de 30K, mas não há um maior surgimento do produto menor (Figura 16b).

Em ambos os casos, o padrão de degradação observado para os fragmentos de tau direccionados à membrana é diferente do observado para a proteína solúvel equivalente. As proteínas direccionadas à membrana podem ser degradadas até um fragmento de 12/14 K equivalente ao domínio nuclear de PHF (ver p.ex. Fig. 17 (a)). A agregação dos fragmentos de tau induzida pela associação à membrana está, portanto, a conferir estabilidade proteolítica ao domínio nuclear, tal como se observa em PHF.

A proteína tau inteira que é induzida na ausência de um fragmento de tau localizado na membrana mostra alguma degradação num fragmento de 45K, mas não há produção de fragmentos menores. A maior produção de fragmentos menores de tau observada quando a tau inteira é expressa com a SStau190-441 (Figura 16a) demonstra o processamento de tau induzido através da interacção com os agregados SStau190-441.

Os produtos de degradação produzidos em células expressando SStau190-441 foram analisadas utilizando anticorpos específicos para epitopos que são ambos NB e C-terminais ao domínio de agregação. Esta análise mostra que a proteína sofre truncagens tanto N-terminais como C-terminais (Figura 17). O menor fragmento produzido reage apenas com o anticorpo contra o domínio nuclear de PHF e é de um tamanho semelhante (12-14K). A proteína tau nestas células parece, portanto, estar a sofrer um processamento semelhante a PHF para o fragmento nuclear.

Ambas as proteínas SStau, juntamente com os seus produtos de degradação, podem ser sedimentados a partir de extractos celulares mesmo na presença do detergente Triton X-100, sugerindo que a proteína está agregada em vez de estar associada a membranas (Figura 18). Uma fracção da proteína sedimenta a uma velocidade relativamente baixa (12000 g), e o restante comporta-se como partículas com um valor de S de pelo menos 50S, mas não sedimenta a 300S, consistente com a agregação a um complexo de PM $1-2 \times 10^6$.

Estes resultados indicam a seguinte via de eventos: agregação, que é inicialmente semeada pela proteína localizada na membrana, ocorre na superfície citosólica do RE. A proteína é clivada no seu terminal N para remover a sequência sinal, e esta forma é então livre para aparecer como agregados no citosol ou como uma proteína ligada aos microtúbulos se não ocorreu agregação. O direccionamento para a membrana da proteína semelhante a tau, tal como ensinado aqui, facilita a captura de tau inteira que é, por exemplo, produzida sob o controlo de um promotor indutível. Mais tau inteira é então canalizada na mesma via de processamento proteolítico, tal como indicado pela produção da unidade de 25 kDa após indução da tau inteira (Figura 1).

Conclusão

A expressão de um fragmento de tau como uma proteína localizada na membrana ultrapassou a barreira à agregação em células que é verificada utilizando proteínas solúveis. O fragmento SS190-390, por exemplo, é eficientemente processado

em fragmentos mais curtos, incluindo o fragmento de 12-14K, que é semelhante ao verificado no núcleo de PHF.

Os inventores descobriram assim que pode ser utilizada uma sequência sinal para criar uma forma de tau localizada na membrana, que os fragmentos de tau assim expressos como proteínas localizadas na membrana formarão agregados e que estes agregados de tau têm um núcleo proteoliticamente estável que é comparável ao de PHF, tanto em relação ao seu tamanho como à presença do epitopo de 7.51. Os inventores identificaram também que o surgimento de fragmentos processados é aumentado após a indução de proteína tau inteira, provando que existe captura de tau solúvel em agregados.

Assim, a agregação de tau e o processamento foram alcançados em células, e os agregados podem ser analisados em ensaios para testar compostos que inibam ou modulem a agregação.

Exemplo 2 - inibidores de pesquisa

As células expressando o fragmento SS190-441 bem como T40 indutível sob o controlo de IPTG foram plaqueadas em caixas de 6 poços. Um dia após o plaqueamento os fármacos experimentais foram adicionados nas concentrações indicadas e 9 h depois, foi adicionado IPTG a 5 mM. 15 h após a adição de IPTG, as células foram lavadas com PBS, depois solubilizadas em tampão do gel. As amostras foram separadas através de SDS-PAGE e *immunoblotted* utilizando anticorpo 7.51. A indução de T40 nestas células conduz a um aumento de produtos de degradação (tal como mostrado na Figura 1, e Figura 16c). O efeito dos fármacos experimentais neste aumento foi analisado através de quantificação dos *immunoblots*.

A Figura 2 mostra como as actividades inibidoras de tionina, clorpromazina e tacrina foram comparadas no modelo celular direccionado à membrana. Há uma clara distinção entre compostos activos e inactivos. Os dados foram analisados em maior detalhe matematicamente utilizando um modelo inibidor padrão (Figura 3).

Os valores que o modelo produz são consistentes com os que seriam esperados para um sistema *in vivo* no qual a tau foi fosforilada, dando uma redução resultante na sua afinidade de ligação, e um aumento concomitante na potência inibidora aparente de inibidores de agregação de tau.

Isto demonstra a utilidade do presente invento na pesquisa de inibidores dos fenómenos de agregação de proteínas que são sujeitos a uma polimerização de conformação induzida em doença neuropatológica. Em particular, a agregação pode ser modificada por inibidores de agregação e a sua actividade pode ser monitorizada através da produção de produtos de degradação característicos.

Exemplo 3 - preparação e utilização de animais transgénicos

Os animais transgénicos foram preparados como se segue.

Animais:

Para obter um grande número de oócitos fertilizados, ratinhos NMRI de 4 semanas de idade são tratados com gonadotrofinas para induzir superovulação. É utilizado soro de éguas grávidas (PMS) para imitar a hormona folículo-estimulante (FSH) e é utilizada gonadotrofina coriônica humana (hCG) para imitar a hormona luteinizante (LH). O PMS é administrado por via intraperitoneal 2 dias antes do acasalamento e a hCG é administrada 46 horas depois. Após a administração de hCG os ratinhos fêmea são acasalados com machos reprodutores. No mesmo dia, ratinhos NMRI de 10 semanas de idade são acasalados com machos vasectomizados, para obter mães adoptivas para o reimplante dos oócitos injectados. Os oócitos fertilizados são colhidos de ratinhos com rolhão de cópula na manhã seguinte.

Colheita de oócitos:

Os ratinhos são sacrificados através de deslocamento cervical e o oviduto é dissecado. Os oócitos recém-ovulados, rodeados por células do cumulus, são verificados na tuba superior do oviduto (ampola). Um oviduto de cada vez é transferido para uma caixa de petri contendo meio M2 e

hialoronidase. Com um par de pinças de relojoeiro os ovócitos podem ser libertados do oviduto. A hialoronidase separa os ovos das células do cumulus. Os oócitos são então separados de quaisquer outras células e material em dois passos sucessivos de limpeza através de meio M2. Até serem necessários os oócitos são armazenados em meio M16 a 37°C numa incubadora de CO₂ de 5%.

Quando os oócitos colhidos estão num estágio pronuclear inicial em que os pronúcleos masculino e feminino estão separados e são distintos do citoplasma.

Preparação da construção de ADN para microinjecção (ver Figura 6):

As construções contêm um ADNc apropriado sob a regulação do promotor de ThyI que dirige a expressão do transgene no cérebro. Os plasmídeos foram extraídos da bactéria hospedeira e purificados através do Qiagen Plasmid Purification Kit (vendido por Qiagen, Hilden, Alemanha). As construções foram linearizadas com uma endonuclease apropriada (NotI). O fragmento desejado foi isolado a partir do gel de agarose utilizando o QIAquick™ Gel Extraction Kit (vendido por Qiagen, Hilden, Alemanha). As construções foram diluídas até 2 ng/uL de tampão de microinjecção.

Microinjecção:

É montado um micromanipulador de cada lado de uma platina de um microscópio invertido; um micromanipulador controla a pipeta seguradora e o outro a pipeta de injecção. Os ovos são colocados numa câmara de injecção de lâmina com depressão com meio M2 coberta com óleo de parafina. Um ovo é posicionado na pipeta seguradora e o pronúcleo masculino é injectado com a pipeta de injecção contendo a solução de ADN. Após a injecção os oócitos são novamente cultivados em meio M16 a 37°C numa incubadora de CO₂ a 5% até re-transferência.

Re-transferência:

Ratinhas pseudográvidas são anestesiadas e os oócitos injectados intactos são retransferidos para o oviduto da

ratinha (10-15 oócitos num oviduto). Estas mães adoptivas levam os embriões implantados até ao termo.

Identificação de ratinhos transgénicos:

Foram utilizadas duas abordagens diferentes para identificar animais transgénicos.

PCR:

Foram detectados ratinhos transgénicos com PCR utilizando iniciadores específicos do transgene.

Thy 1F2: gCA ggA ggT gCT CAg ggA CAg c

TautxR: CAC TgC CgC CTC CCg ggA CgT g

Esta combinação de iniciadores produz um fragmento de PCR de 415 pb apenas em ratinhos possuindo o transgene ThyI-sstau296-390 e um fragmento de PCR de 711 pb nos ratinhos possuindo o transgene ThyI-sstau186-441.

O ADN genómico foi preparado a partir de 0,5 cm de cauda de ratinho utilizando o DNeasy™ Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha)

Southern Blot

10 µg de ADN genómico de animais que testaram positivo em PCR foram digeridos com EcoRI e sujeitos a electroforese num gel de agarose a 1%. *Southern blots* foram preparados e hibridados com 2 fragmentos marcados com ³²P do promotor. Estes foram obtidos através de digestão com XbaI e NcoI. O sinal endógeno pode ser comparado com o sinal do transgene para estimar o número de cópias.

Para testar o modo de integração o ADN genómico foi digerido com XbaI. Os animais Fundador 1 e F1 apresentaram uma única integração. Os animais Fundador 86 e F1 apresentaram uma integração dupla e podiam ser divididos em duas linhas independentes.

As membranas foram hibridadas a 65°C durante 20 horas e lavadas a 65°C 2x 1 hora.

Expressão de ARN

Para estudar a expressão de ARN foi realizada análise de *Northern blot*. ARN foi preparado a partir de cérebro inteiro utilizando Trizol™ (Gibco BRL, Paisley, Escócia). 20 µg de ARN foram sujeitos a electroforese e transferidos para membrana. A hibridação foi efectuada contra um fragmento de PCR de 247 pb. Os iniciadores foram específicos do transgene: glob578-597 (AAG AAC AAT CAA ggg T CC CC), oligo20 (ATT Agg CAA CAT CCA TCA TAA ACC).

As membranas foram hibridadas a 65°C durante 20 horas e lavadas a 65°C 2x 1 hora.

As Figuras 12-15 mostram os resultados obtidos com o modelo de ratinho e descrevem como uma espécie de 18 kDa é gerada através de processamento proteolítico dependente de agregação de tau de cérebro de ratinho endógena através de uma via que se crê corresponder à dada na Figura 1(E).

Referências

- Arendt et al. (1995) *Neuroscience* 69: 691-698.
Braak et al. (1994) *Neuroscience letters* 171: 1-4.
Brion et al. (1999) *American Journal of Pathology* 154: 255-270.
Cork et al. (1988) *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 49: 629-641.
Duff et al. (2000) *Neurobiology of Disease* 7: 87-98.
Geula et al. (1998) *Nature Medicine* 4: 827-834.
Gotz et al. (1995) *EMBO Journal* 14: 1304-1313.
Harada et al. (1994) *Nature* 369: 488-491.
Ikegami et al. (2000) *Neuroscience letters* 279: 129-132.
Ishihara et al. (1999) *Neuron* 24: 751-762.
Janus et al. (2000) *Biochimica et Biophysica Acta* 1502: 63-75.
Lewis et al. (2000) *Nature Genetics* 25: 402-405.
Nelson et al. (1995) *Neurobiology of Aging* 16: 315-323.
Roertgen et al. *Neurobiology of Aging* 17: 243-247.

Schultz et al. (2000) *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 59: 39-52.

Spittaels et al. (1999) *American Journal of Pathology* 155: 2153-2165.

Sturchler-Pierrat et al. (1997) *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 93: 13287-13292.

Thunecke et al. (2000) não publicado.

Referências Adicionais

Abrahamson, M., Jonsdottir, S., Olafsson, I. & Grubb, A. (1992) "Hereditary cystatin C amyloid angiopathy identification of the disease-causing mutation and specific diagnosis by polymerase chain reaction based analysis". *Human Genetics* 89: 377-380.

Booth, D.R., Sunde, M., Bellotti, V., Robinson, C.V., Hutchinson, W.L., Fraser, P.E., Hawkins, P.N., Dobson, C.M., Radford, S.E., Blake, C.C.F. & Pepys, M.B. (1997) "Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis". *Nature* 385: 787-793.

Carrell, R.W. & Gooptu, B. (1998) "Conformational changes and disease-serpins, prions and Alzheimer's". *Current Opinion in Structural Biology* 8: 799-809.

Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M., Ramponi, G. & Dobson, C. (1999) "Designing conditions for *in vitro* formation of amyloid protofilaments and fibrils". *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 96: 3590-3594.

Czech, C., Tremp, G. & Pradier, L. (2000) "Presenilins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanisms". *Progress in Neurobiology* 60: 363-384.

Davis, R.L., Shrimpton, A.E., Holohan, P.D., Bradshaw, C., Feiglin, D., Collins, G.H., Sonderegger, P., Kinter, J., Becker, L.M., Lacbawan, F., Krasnewich, D., Muenke, M., Lawrence, D.A., Yerby, M.S., Shaw, C.-M., Gooptu, B., Elliott, P.R., Finch, J.T., Carrell, R.W. & Lomas, D.A. (1999) "Familial dementia caused by polymerization of mutant neuroserpin". *Nature* 401: 376-379.

DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K.O., Davies, S.W., Bates, G.P., Vonsattel, J.P. & Aronin, N. (1997) "Aggregation

of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain". *Science* 277: 1990-1993.

Dische, F.E., Wernstedt, C., Westermark, G.T., Westermark, P., Pepys, M.B., Rennie, J.A., Gilbey, S.G. & Watkins, P.J. (1988) "Insulin as an amyloid-fibril protein at sites of repeated insulin injections in a diabetic patient". *Diabetologia* 31: 158-161.

Gasset, M., Bladwin, M.A., Lloyd, D.H., Gabriel, J.-M., Holtzman, D.M., Cohen, F.E., Fletterick, R. & Prusiner, S.B. (1992) "Predicted α -helical region of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid". *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 89: 10940-10944.

Glenner, G.G. & Wong, C.W. (1984) "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 120: 885-890.

Goate, A., Chartier-Harlin, M.-C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., Mant, R., Newton, P., Rooke, K., Roques, P., Talbot, C., Pericak-Vance, M., Roses, A., Williamson, R., Rossor, M., Owen, M. & Hardy, J. (1991) "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease". *Nature* 349: 704-706.

Gorevic, P.D., Casey, T.T., Stone, W.J., DiRaimondo, C.R., Prelli, F.C. & Frangione, B. (1985) "b-2 Microglobulin is an amyloidogenic protein in man". *Journal of Clinical Investigation* 76: 2425-2429.

Gustavsson, A., Engstrom, U. & Westermark, P. (1991) "Normal transthyretin and sintetic transthyretin fragments form amyloid-like fibrils *in vitro*". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 175: 1159-1164.

Hutton, M., Lendon, C., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., Hackett, J., Adamson, J., Lincoln, S., Dickson, D., Davies, P., Petersen, R.C., Stevens, M., de Graaf, E., Wauters, E., van Baren, J., Hillebrand, M., Joosse, M., Kwon, J.M., Nowotny, P., Che, L.K., Norton, J., Morris, J.C., Reed, L.A., Trojanowski, J.Q., Basun, H., Lannfelt, L., Neystat, M., Fahn, S., Dark, F., Tannenberg, T., Dodd, P.R., Hayward, N., Kwok, J.B.J., Schofield, P.R., Andreadis, A., Snowden, J., Craufurd, D., Neary, D., Owen,

F., Oostra, B.A., Hardy, J., Goate, A., van Swieten, J., Mann, D., Lynch, T. & Heutink, P. (1998) "Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17". *Nature* 393: 702-705.

Johansson, B., Wernstedt, C. & Westermark, P. (1987) "Atrial natriuretic peptide deposited as atrial amyloid fibrils". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 148: 1087-1092.

Lomas, D.A., Evans, D.L., Finch, J.T. & Carrell, R.W. (1992) "The mechanism of Z α 1-antitrypsin accumulation in the liver". *Nature* 357: 605-607.

Maury, C.P. & Baumann, M. (1990) "Isolation and characterization of cardiac amyloid in familial amyloid polyneuropathy type IV (Finnish): relation of the amyloid protein to variant gelsolin". *Biochimica et Biophysica Acta* 1096: 84-86.

Paulson, H.L. (1999) "Human genetics '99: trinucleotide repeats". *American Journal of Human Genetics* 64: 339-345.

Pepys, M.B., Hawkins, P.N., Booth, D.R., Vigushin, D.M., Tennent, G.A., Soutar, A.K., Totty, N., Nguyen, O., Blake, C.C.F., Terry, C.J., Feast, T.G., Zalin, A.M. & Hsuan, J.J. (1993) "Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis". *Nature* 362: 553-557.

Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papaetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R.C., Di Iorio, G., Golbe, L.I. & Nussbaum, R.L. (1997) "Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease". *Science* 276: 2045-2047.

Prusiner, S.B., Scott, M.R., DeArmond, S.J. & Cohen, F.E. (1998) "Prion protein biology". *Cell* 93: 337-348.

Shibata, N., Hirano, A., Kobayashi, M., Siddique, T., Deng, H.X., Hung, W.Y., Kato, T. & Asayama, K. (1996) "Intense superoxide dismutase-1 immunoreactivity in intracytoplasmic hyaline inclusions of familial amyotrophic lateral sclerosis with posterior column involvement". *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 55: 481-490.

Sletten, K., Westermark, P. & Natvig, J.B. (1976) "Characterization of amyloid fibril proteins from medullary

carcinoma of the thyroid". *Journal of Experimental Medicine* 143: 993-998.

Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M. & Goedert, M. (1998) "a-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies". *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95: 6469-6473.

Uemichi, T., Liuepnicks, J.j. & Benson, M.D. (1994) "Hereditary renal amyloidosis with a novel variant fibrinogen". *Journal of Clinical Investigation* 93: 731-736.

Westermarck, P., Engstrom, U., Johnson, K.H., Westermarck, G.T. & Betsholtz, C. (1990) "Islet amyloid polypeptide: pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation". *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 87: 5036-5040.

Westermarck, P., Johnson, K.H., O'Brien, T.D. & Betsholtz, C. (1992) "Islet amyloid polypeptide-a novel controversy in diabetes research". *Diabetologia* 35: 297-303.

Westermarck, P., Johnson, K.H. & Pitkanen, P. (1985) "Systemic amyloidosis: A review with emphasis on pathogenesis". *Applied Physiology* 3: 55-68.

Wischik, C.M., Novak, M., Thogersen, H.C., Edwards, P.C., Runswick, M.J., Jakes, R., Walker, J.E., Milstein, C., M., R. & Klug, A. (1988) "Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer's disease". *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 85: 4506-4510.

Lisboa, 2012-06-06

REIVINDICAÇÕES

1. Método de indução ou modelação do estado patológico de uma proteína de doença de agregação (ADP) que está associada a um estado de doença no qual a ADP se agrega patologicamente através de interacção de polimerização conformacional induzida, sendo o método caracterizado pelo passo de proporcionar uma proteína de fusão localizável na membrana compreendendo (i) uma porção de agregação, que é derivada da ADP, (ii) uma porção heteróloga localizada na membrana, em que o referido método é efectuado *in vitro*, ou é efectuado numa célula ou linha celular cultivada, ou é efectuado num animal não humano.

2. Método tal como reivindicado na reivindicação 1 em que a porção de agregação da proteína de fusão é derivada da ADP, e em que a localização na membrana da proteína de fusão faz com que o local de captura de elevada afinidade da proteína ADP se torne exposto de modo a que seja promovida a agregação de mais ADP, e a agregação patológica da ADP no estado de doença conduz a processamento proteolítico da ADP num fragmento do domínio nuclear.

3. Método tal como reivindicado na reivindicação 1 ou reivindicação 2 compreendendo os passos de:

- (a) proporcionar a proteína de fusão
- (b) introdução desta numa membrana.

4. Método tal como reivindicado em qualquer uma das reivindicações anteriores em que a agregação da ADP no estado de doença está associada a neurodegeneração e/ou demência clínica.

5. Método tal como reivindicado na reivindicação 4 em que a porção de agregação compreende, ou consiste essencialmente em, pelo menos o fragmento nuclear da ADP.

6. Método tal como reivindicado em qualquer uma das reivindicações anteriores em que a porção de localização na membrana inclui uma sequência âncora membrana e/ou uma sequência de paragem de transferência.

7. Método tal como reivindicado em qualquer uma das reivindicações anteriores em que a doença é seleccionada a partir da doença de Pick, Paralisia Supranuclear Progressiva, doença de Alzheimer.

8. Método tal como reivindicado em qualquer uma das reivindicações anteriores em que a ADP é proteína tau.

9. Método tal como reivindicado na reivindicação 8 em que a porção de agregação da proteína de fusão compreende um fragmento nuclear de tau, fragmento de tau esse que se estende dos aminoácidos 186-296 a 390-441 da proteína tau inteira mostrada na Fig. 5.

10. Método tal como reivindicado na reivindicação 9 em que a porção de agregação da proteína de fusão consiste nos resíduos de aminoácidos 296-390, 190-441 ou 190-390 da proteína inteira.

11. Método tal como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 2 a 10 para pesquisa de um parceiro de ligação específico do local de captura de elevada afinidade de ADP, o método compreendendo os passos de:

(a) proporcionar a proteína de fusão na forma localizada na membrana,

(b) colocar em contacto a proteína de fusão com um ou mais potenciais parceiros de ligação, em que o referido passo de contacto é intracelular e o parceiro de ligação está presente dentro da célula,

(c) determinação de se o potencial parceiro de ligação se liga ou não à proteína de fusão.

12. Método tal como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 10 para indução da agregação de moléculas de ADP, o método compreendendo os passos de:

(a) proporcionar a proteína de fusão na forma localizada na membrana,

(b) causar ou permitir uma interacção de polimerização conformacional induzida entre a proteína de fusão e uma outra molécula de ADP que é ADP ou um derivado desta, e

(c) monitorização da extensão da agregação da outra molécula de ADP.

13. Método tal como reivindicado na reivindicação 12 em que a membrana é uma membrana celular e a agregação ocorre intracelularmente.

14. Método tal como reivindicado na reivindicação 13 em que o passo (a) consiste em:

- introdução da proteína de fusão numa célula, tal que se torna localizada na membrana numa membrana na célula, ou
- introdução de um ácido nucleico codificando a proteína de fusão numa célula ou num ancestral desta, tal que a proteína de fusão é expressa na célula e se torna localizada na membrana numa membrana na célula.

15. Método tal como reivindicado na reivindicação 14 em que a outra molécula de ADP é ADP inteira, solúvel que é nativa da célula.

16. Método tal como reivindicado na reivindicação 13 ou reivindicação 14 em que a outra molécula de ADP é heteróloga à célula e o método compreende o passo de introdução de um ácido nucleico codificando a outra molécula de ADP na célula ou num ancestral desta, de modo que a outra molécula de ADP seja expressa na célula.

17. Método tal como reivindicado na reivindicação 16 em que a proteína de fusão é expressa sob o controlo da transcrição de um promotor constitutivo, e a outra molécula de ADP é expressa sob o controlo da transcrição de um promotor indutível na presença do agente de indução apropriado.

18. Método tal como reivindicado na reivindicação 16 ou reivindicação 17 em que a outra molécula de ADP é um derivado de ADP que é (i) um fragmento da ADP, (ii) um mutante da ADP, ou (iii) ADP inteira, solúvel.

19. Método tal como reivindicado na reivindicação 16 ou reivindicação 18 em que a outra molécula de ADP incorpora mutações na ADP correspondendo às que se sabe ou suspeita estarem associadas ao estado de doença.

20. Método tal como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 12 a 19 em que a agregação é monitorizada através da monitorização da concentração ou do nível de qualquer uma ou mais das seguintes espécies: (i) proteína de fusão não agregada e/ou outra molécula de ADP, (ii) um agregado da proteína de fusão e/ou outra molécula de ADP, (iii) um fragmento proteolítico da proteína de fusão e/ou outra molécula de ADP resultando da agregação desta.

21. Método tal como reivindicado na reivindicação 20 em que a ADP é tau, e a agregação é monitorizada com base nos níveis crescentes de um fragmento de tau de aproximadamente 18 ou 25 kDa.

22. Método tal como reivindicado na reivindicação 20 ou reivindicação 21 em que o passo de monitorização compreende a utilização de um anticorpo específico para qualquer um de (i) uma proteína de fusão (ii) a outra molécula de ADP (iii) um fragmento proteolítico da proteína de fusão e/ou outra molécula de ADP resultando da agregação desta.

23. Método tal como reivindicado na reivindicação 22 em que a proteína de fusão é imunologicamente distinta da outra proteína ADP, e a ADP é tau, e o anticorpo é seleccionado a partir de um anticorpo monoclonal que (i) é específico para um epitopo específico de humano localizado na região entre Gly-16 e Gln-26 de tau; (ii) é específico para o fragmento nuclear de tau truncado em Glu-391; (iii) é específico para um epitopo de tau genérico no domínio de repetição; ou (iv) é específico para um epitopo de tau genérico não específico da espécie localizado entre Ser-208 e Ser-238.

24. Método para identificação de um modulador da agregação de uma proteína de doença de agregação (ADP) que está associado a um estado de doença no qual a ADP se agrega patologicamente através de uma interacção de polimerização conformacional induzida, cujo método compreende:

(a) realização de um método tal como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 12 a 23 na presença de um agente suspeito de ser capaz de modular a agregação,

(b) monitorização da extensão da agregação, e

(c) correlação da extensão da agregação com a actividade moduladora do agente.

25. Método tal como reivindicado na reivindicação 24 que é realizado intracelularmente.

26. Método tal como reivindicado na reivindicação 25 em que a célula é de uma linha celular neuronal ou uma linha celular de fibroblastos.

27. Método tal como reivindicado na reivindicação 25 em que a célula está compreendida dentro de um animal transgénico não humano.

28. Molécula de ácido nucleico isolada compreendendo uma sequência nucleotídica quimérica codificando uma proteína de fusão localizável na membrana possuindo (i) uma porção de agregação, que é derivada de uma proteína de doença de agregação (ADP) que está associada a um estado de doença no qual a ADP se agrega patologicamente através de uma interacção de polimerização conformacional induzida (ii) uma porção heteróloga localizada na membrana.

29. Ácido nucleico tal como reivindicado na reivindicação 28 em que a sequência nucleotídica quimérica inclui uma sequência 3'UTR exógena, e em que a porção de localização na membrana compreende uma sequência sinal e opcionalmente uma sequência codificando um domínio âncora de membrana ou uma sequência de paragem de transferência.

30. Ácido nucleico tal como reivindicado na reivindicação 28 ou reivindicação 29 em que a sequência nucleotídica da porção de agregação codifica tau, ou um fragmento nuclear de tau.

31. Ácido nucleico tal como reivindicado na reivindicação 30 em que a sequência nucleotídica da porção de agregação codifica um fragmento truncado de tau prolongando-se de entre os aminoácidos 186-296 a 390-441 da proteína inteira.

32. Ácido nucleico tal como reivindicado na reivindicação 31 em que a sequência nucleotídica da porção de agregação codifica os aminoácidos 296-390, 190-441 ou 190-390.

33. Processo para produção de um ácido nucleico tal como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 28 a 32 compreendendo o passo de ligação de um ácido nucleico codificando a porção de agregação a um ácido nucleico codificando a porção heteróloga de localização na membrana, e em que o ácido nucleico codificando a porção heteróloga de localização na membrana é parte de um vector recombinante no qual é inserido o ácido nucleico codificando a porção de agregação.

34. Vector recombinante que compreende o ácido nucleico de qualquer uma das reivindicações 28 a 32 em que o ácido nucleico é operativamente ligado a um promotor para transcrição numa célula hospedeira.

35. Vector tal como reivindicado na reivindicação 34 em que o promotor é seleccionado a partir de: um promotor específico de tecido; o promotor específico de prião; ou o promotor da enolase neuroespecífico.

36. Método que compreende o passo de introdução do vector da reivindicação 34 ou reivindicação 35 numa célula hospedeira.

37. Célula hospedeira contendo ou transformada com um vector heterólogo da reivindicação 34 ou reivindicação 35.

38. Método de preparação de um modelo animal não humano transgénico com patologia aumentada ou acelerada para o estado de doença no qual uma proteína de doença de agregação (ADP) se agrega patologicamente, método esse que compreende o passo de introdução num ovo fertilizado do animal de um vector tal como reivindicado em qualquer uma da reivindicação 34 ou reivindicação 35.

39. Animal não humano transgénico que inclui dentro de uma pluralidade das suas células um promotor operativamente

ligado a uma sequência nucleotídica codificando a proteína de fusão localizável na membrana compreendendo (i) uma porção de agregação, que é derivado de uma proteína de doença de agregação (ADP) que está associada a um estado de doença no qual a ADP se agrega patologicamente através de uma interacção de polimerização conformacional induzida (ii) uma porção heteróloga localizada na membrana.

40. Célula ou amostra de tecido do animal da reivindicação 39 compreendendo um promotor operativamente ligado a uma sequência nucleotídica codificando a proteína de fusão localizável na membrana.

41. Método, animal ou amostra tal como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 38 a 40 em que o animal é um roedor.

42. Uma proteína de fusão isolada que é codificada por uma sequência nucleotídica quimérica de qualquer uma das reivindicações 28 a 32.

43. Método de produção da proteína da reivindicação 42, método esse que compreende o passo de causar ou permitir a expressão a partir de um ácido nucleico de qualquer uma das reivindicações 28 a 32 numa célula hospedeira adequada.

44. Método de indução no animal não humano transgénico da reivindicação 39 de um estado de doença no qual a proteína de doença de agregação (ADP) se agrega patologicamente, método esse que compreende causar ou permitir a expressão da sequência nucleotídica codificando a proteína de fusão localizável na membrana.

45. Método para pesquisar um agente para utilizar como agente terapêutico, de prognóstico ou diagnóstico num estado de doença em que uma proteína de doença de agregação (ADP) se agrega patologicamente, compreendendo a realização de um método tal como reivindicado na reivindicação 44 na presença de um agente suspeito de ser capaz de modular a agregação.

46. Método tal como reivindicado na reivindicação 27 ou reivindicação 45 em que o agente é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica.

47. Método tal como reivindicado nas reivindicações 27, 45 ou 46 em que qualquer um dos seguintes é determinado dentro do cérebro do animal:

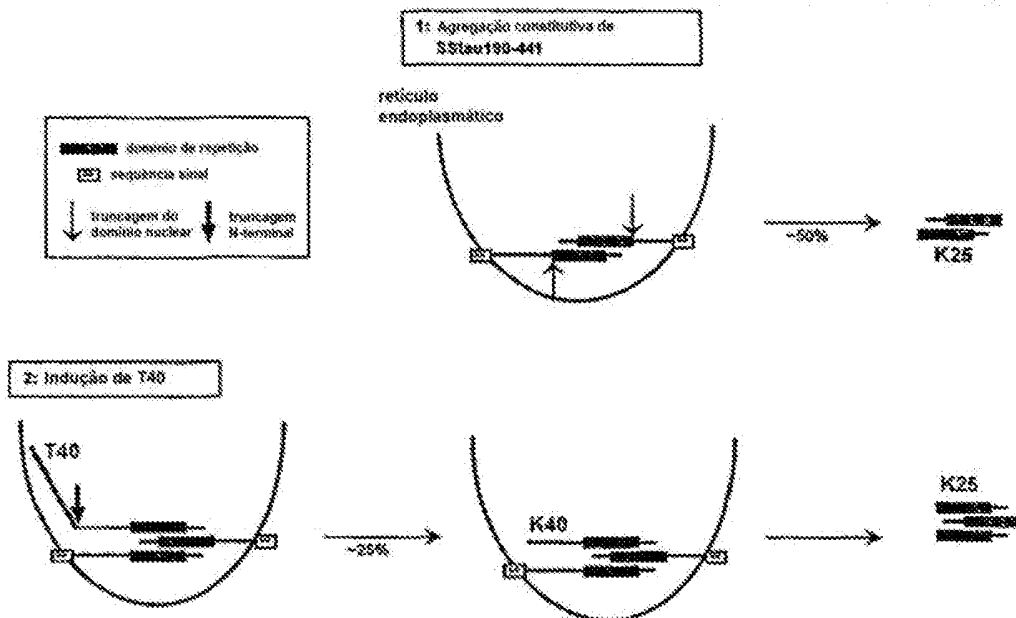
- (i) a extensão do processamento proteolítico da ADP,
- (ii) a capacidade do agente para diminuir a quantidade de agregados de ADP que se formam,
- (iii) a capacidade do agente para eliminar ou reduzir o nível de agregados de ADP já formados.

48. Método tal como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 44 a 47 em que a ADP é tau e o estado de doença corresponde à doença de Alzheimer.

49. Animal tal como reivindicado na reivindicação 39 em que a ADP é tau e o estado de doença corresponde à doença de Alzheimer.

Lisboa, 2012-06-06

(a) A sementeira através de SStau190-441 Induz Degradação em dois Estádios de T40 Através de Agregação Através do Domínio Nuclear de PHF. Produção de fragmento de 25 kDa



(b) A Agregação de SStau190-441 Produz Fragmentos de 30 kDa, 18 kDa e 12/14 kDa

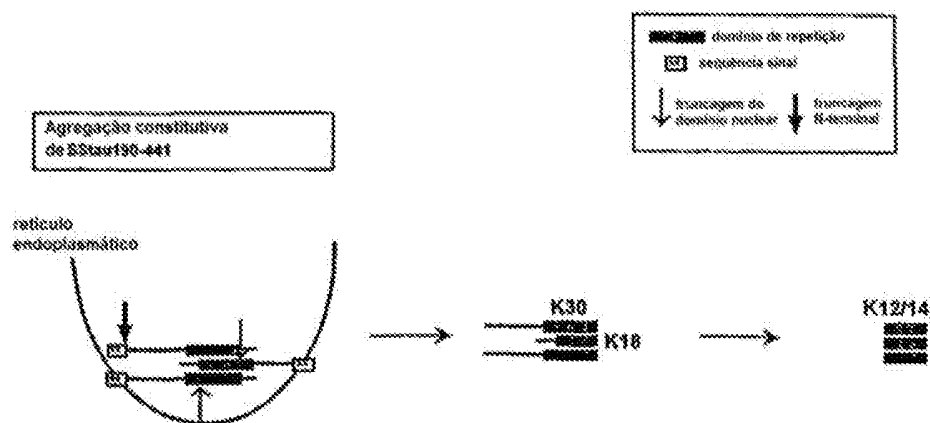
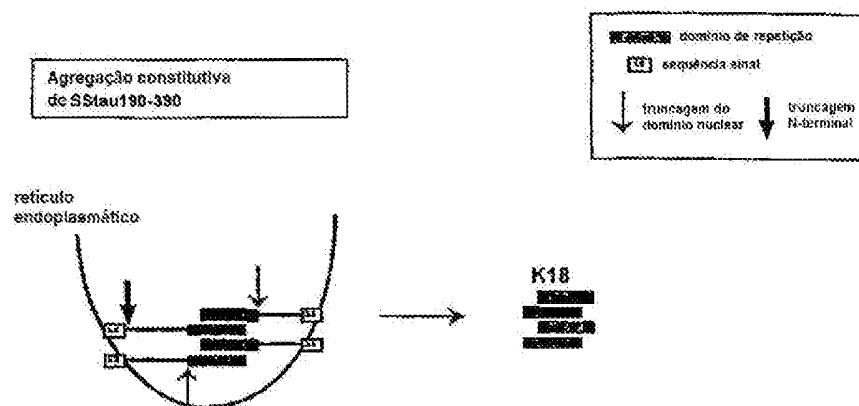


Figura 1a e 1b

(c)

A Agregação de SStau190-390 Produz um Fragmento de 18 Kda



(d)

A Agregação de SStau296-390: Interação com T40 Produz Dois Possíveis Fragmentos de 18 kDa e um Fragmento de 12/14 kDa

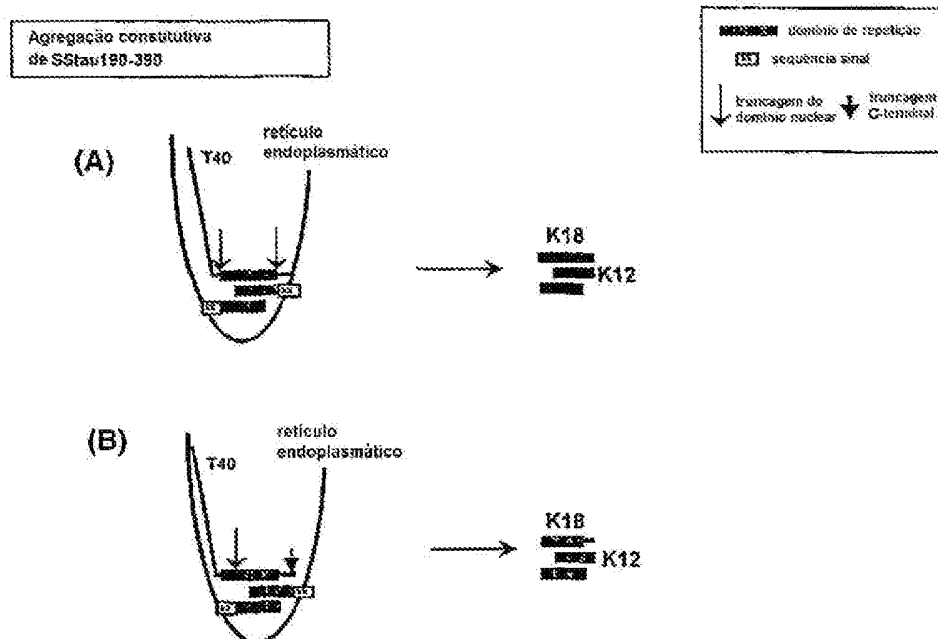


Figure 1c e 1d

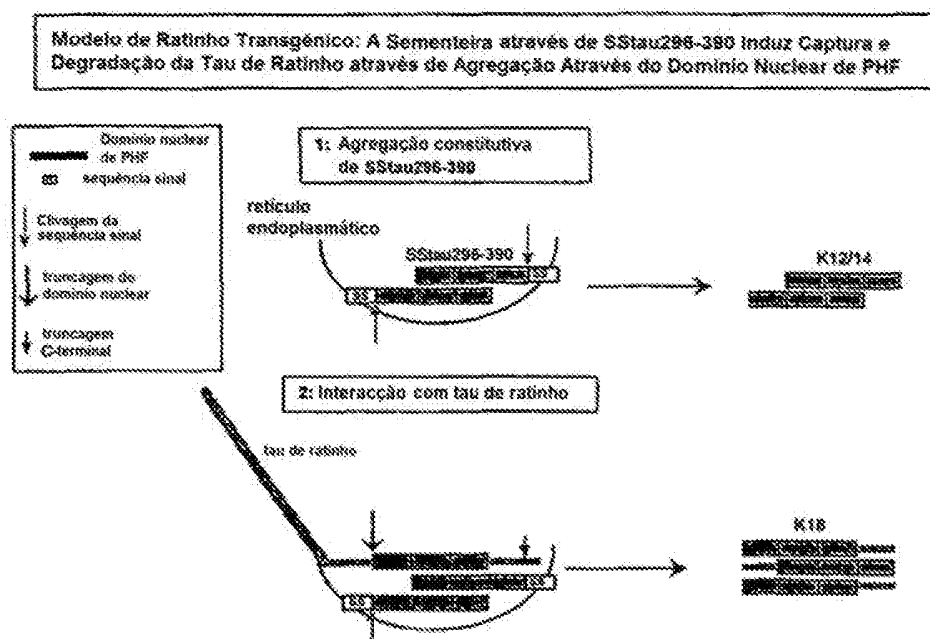


Figura 1c

Actividades de compostos no ensaio celular

$\uparrow T40 + 40 \text{ kD} \Rightarrow \uparrow 25 \text{ kD}$

Resultados mostrados como produção relativa da
banda de 25 kDa

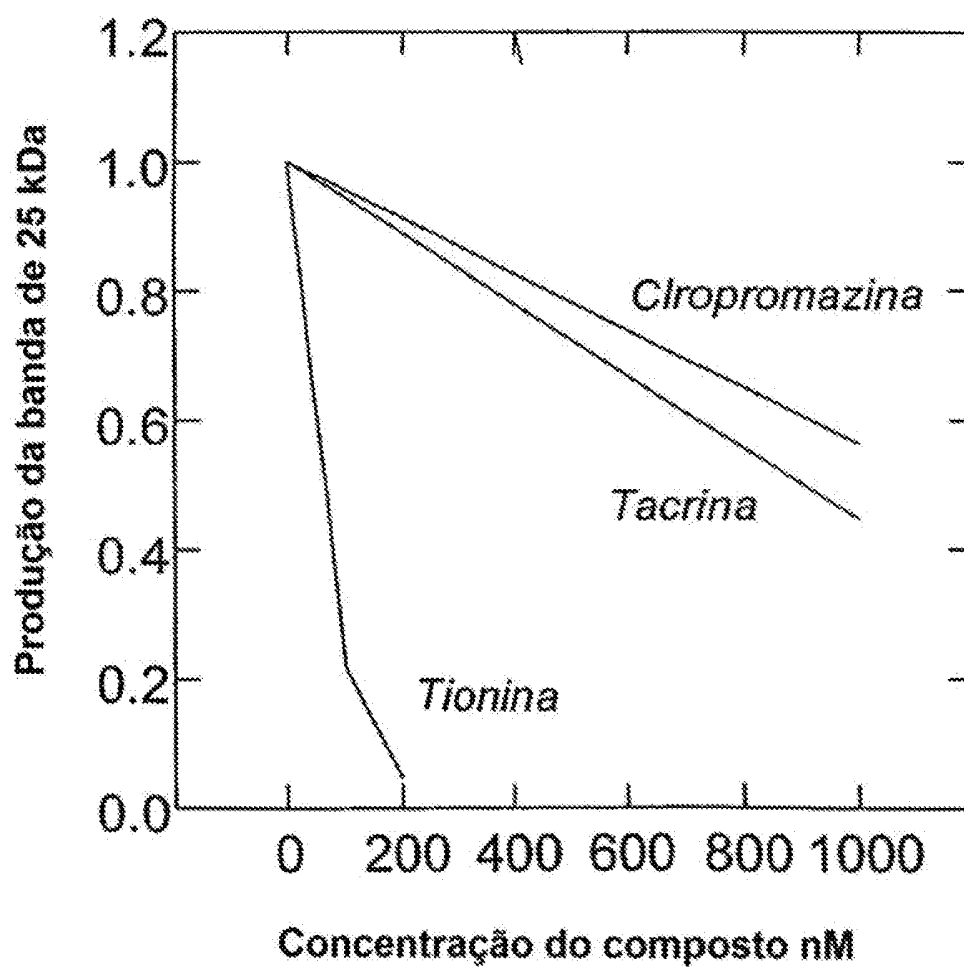


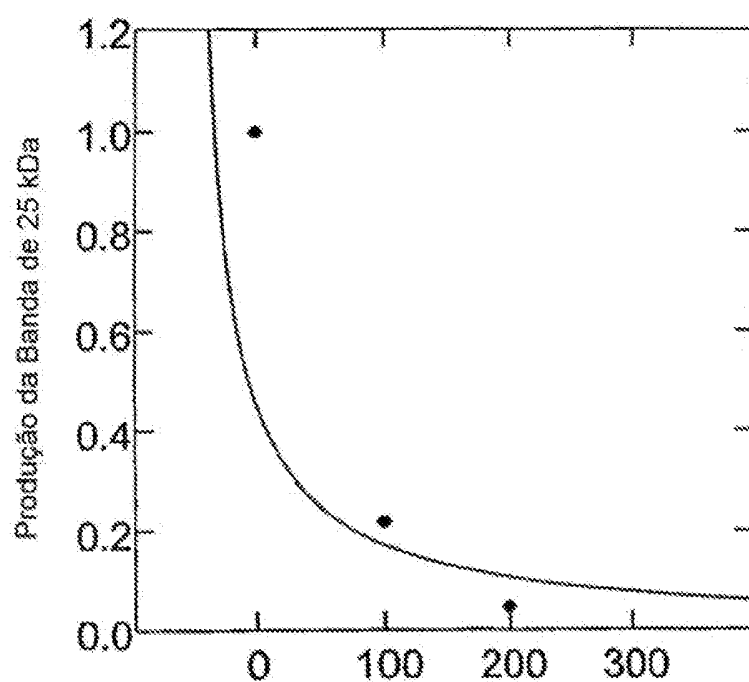
Figura 2

Tionina: modelo memb-Tau

ensaio celular $\uparrow T40 + 40 \text{ kD} \Rightarrow \uparrow 25 \text{ kDa}$

Actividade celular prevista através do modelo de inibição padrão:

$$\text{Actividade} = [\text{tau}] / ([\text{tau}] + K_{da} * (1 + [\text{tionina}] / K_I))$$



Actividade observada vs prevista

$r = 0.999$

Concentração intracelular de tau

415 nM

Afinidade da ligação tau-tau

500 nM

K_I de tionina

33 nm

Figura 3

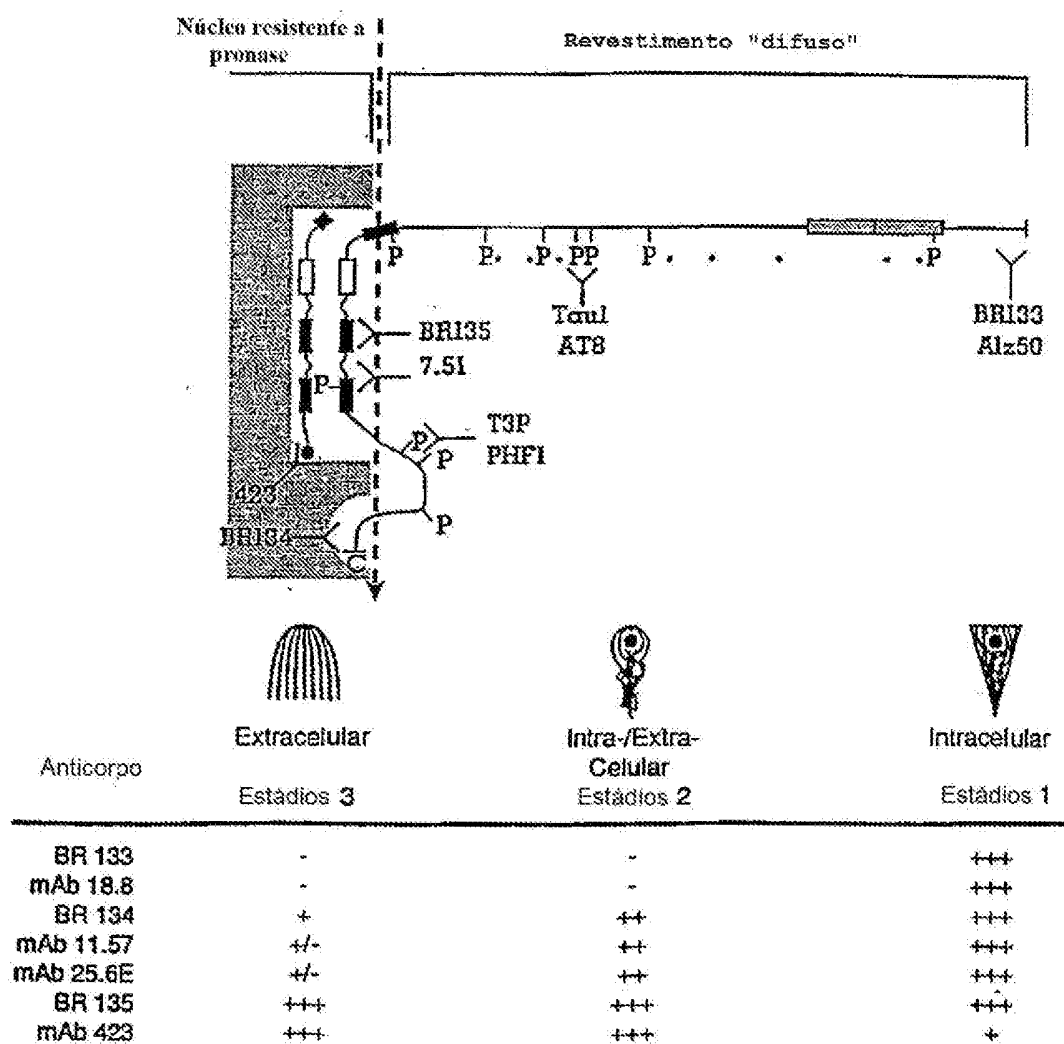


Figura 4a

Truncagem N e C-terminal de tau

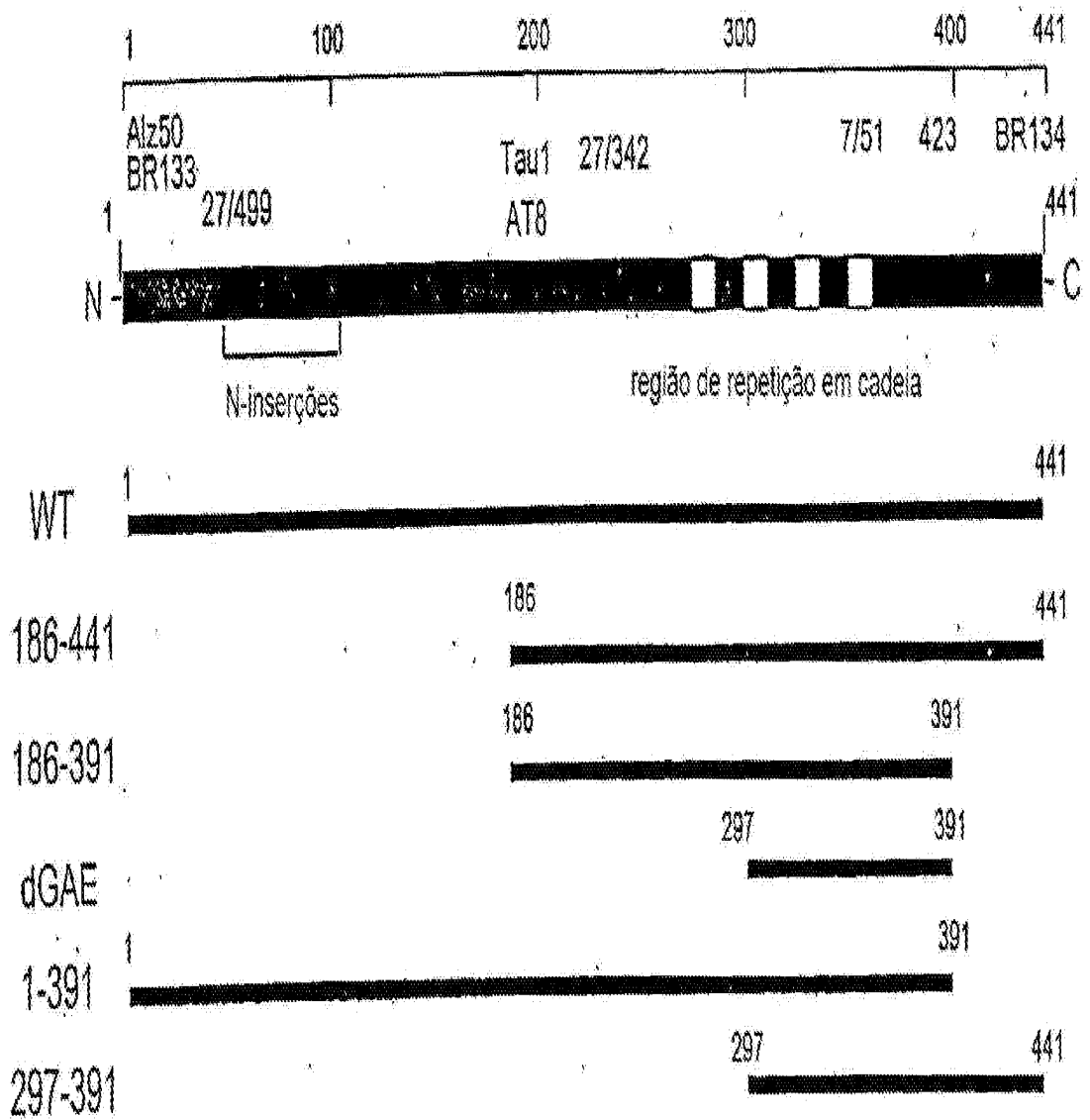


Figura 4b

```

ATG GCT GAG CCC CGC CAG GAG TTC GAA GTG ATG GAA GAT CAC GCT GGG ACG TAC GGG TTG
Met ala glu pro arg gln glu phe glu val met glu asp his ala gly thr tyr gly leu
1      5      10      15      20
GGG GAC AGG AAA GAT CAG GGG GGC TAC ACC ATG CAC CAA GAC CAA GAG GGT GAC ACG GAC
gly asp arg lys asp gln gly gly tyr thr met his gln asp gln glu gly asp thr asp
25      30      35      40
GCT GGC CTG AAA GAA TCT CCC CTG CAG ACC CCG ACT GAG GAC GGA TCT GAG GAA CCG GGC
ala gly leu lys glu ser pro leu gln thr pro thr glu asp gly ser glu glu pro gly
45      50      55      60
TCT GAA ACC TCT GAT GCT AAG AGC ACT CCA ACA GCG GAA GAT GTG ACA GCA CCC TTA GTG
ser glu thr ser asp ala lys ser thr pro thr ala glu asp val thr ala pro leu val
65      70      75      80
GAT GAG GGA GCT CCC GGC AAG CAG GCT GCC GCG CAG CCC CAC ACG GAG ATC CCA GAA GGA
asp glu gly ala pro gly lys gln ala ala ala gln pro his thr glu ile pro glu gly
85      90      95      100
ACC ACA GCT GAA GAA GCA GGC ATT GGA GAC ACC CCC AGC CTG GAA GAC GAA GCT GCT GGT
thr thr ala glu glu ala gly ile gly asp thr pro ser leu glu asp glu ala ala gly
105      110      115      120
CAC GTG ACC CAA GCT CGC ATG GTC AGT AAA AGC AAA GAC GGG ACT GGA AGC GAT GAC AAA
his val thr gln ala arg met val ser lys ser lys asp gly thr gly ser asp asp lys
125      130      135      140
AAA GCC AAG GGG GCT GAT GGT AAA ACG AAG ATC GCC ACA CCG CCG GGA GCA GCC CCT CCA
lys ala lys gly ala asp gly lys thr lys ile ala thr pro arg gly ala ala pro pro
145      150      155      160
GGC CAG AAG GGC CAG GCC AAC GCC ACC AGC ATT CCA GCA AAA ACC CCG CCC GCT CCA AAG
gly gln lys gly gln ala asn ala thr arg ile pro ala lys thr pro pro ala pro lys
165      170      175      180
ACA CCA CCC AGC TCT GGT GAA CCT CCA AAA TCA GGG GAT CGC AGC GGC TAC AGC AGC CCC
thr pro pro ser ser gly glu pro pro lys ser gly asp arg ser gly tyr ser ser pro
185      190      195      200
GGC TCC CCA GGC ACT CCC GGC AGC CGC TCC CGC ACC CCG TCC CTT CCA ACC CCA CCC ACC
gly ser pro gly thr pro gly ser arg ser arg thr pro ser leu pro thr pro pro thr
205      210      215      220
CGG GAG CCC AAG AAG GTG GCA GTG CTC CGT ACT CCA CCC AAG TCG CCG TCT TCC GCC AAG
arg glu pro lys lys val ala val val arg thr pro pro lys ser pro ser ser ala lys
225      230      235      240
AGC CGC CTG CAG ACA GCC CCC GTG CCC ATG CCA GAC CTG AAG AAT GTC AAG TCC AAG ATC
ser arg leu gln thr ala pro val pro met pro asp leu lys asn val lys ser lys ile
245      250      255      260
GGC TCC ACT GAG AAC CTG AAG CAC CAG CCG GGA GGC GGG AAG GTG CAG ATA ATT AAT AAG
gly ser thr glu asn leu lys his gln pro gly gly gly lys val gln ile ile asn lys
265      270      275      280
AAG CTG GAT CTT AGC AAC GTC CAG TCC AAG TGT GGC TCA AAG GAT AAT ATC AAA CAC GTC
lys leu asp leu ser asn val gln ser lys cys gly ser lys asp asn ile lys his val
285      290      295      300
CCG GGA GGC GGC AGT GTG CAA ATA GTC TAC AAA CCA GTT GAC CTG AGC AAG GTG ACC TCC
pro gly gly gly ser val gln ile val tyr lys pro val asp leu ser lys val thr ser
305      310      315      320
AAG TGT GGC TCA TTA GGC AAC ATC CAT CAT AAA CCA GGA GGT GGC CAG GTG GAA GTA AAA
lys cys gly ser leu gly asn ile his his lys pro gly gly gly gln val glu val lys
325      330      335      340
TCT GAG AAG CTT GAC TTC AAG GAC AGA GTC CAG TCG AAG ATT GGG TCC CTG GAC AAT ATC
ser glu lys leu asp phe lys asp arg val gln ser lys ile gly ser leu asp asn ile
345      350      355      360
ACC CAC GTC CCT GGC GGA GGA AAT AAA AAG ATT GAA ACC CAC AAG CTG ACC TTC CGC GAG
thr his val pro gly gly gly asn lys lys ile glu thr his lys leu thr phe arg glu

```

Figura 5a

```

          365          370          375          380
AAC GCC AAA GCC AAG ACA GAC CAC GGG GCG GAG ATC GTG TAC AAG TCG CCA GTG GTG TCT
asn ala lys ala lys thr asp his gly ala glu ile val tyr lys ser pro val val ser
          385          390          395          400
GGG GAC ACG TCT CCA CGG CAT CTC AGC AAT GTC TCC TCC ACC GGC AGC ATC GAC ATG GTA
gly asp thr ser pro arg his leu ser asn val ser ser thr gly ser ile asp met val
          405          410          415          420
GAC TCG CCC CAG CTC GGC ACG CTA GCT GAC GAG GTG TCT GCC TCC CTG GCC AAG CAG GGT
asp ser pro gln leu ala thr leu ala asp glu val ser ala ser leu ala lys gln gly
          425          430          435          440
TTG TGA
leu ***

```

Figura 5a cont...

parenteses quadrados indica a sequência sinal
 negrito indica segmentos de ligação à tubulina

SStau186-441

[MKWVTFLLLLFISGSAFSPV]**KSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPP**
TREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLK**NVKSKIGSTENLKHQP**
GGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGG**SVQIVYK**PVDLSKVTSK
CGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVP**GGGNKKIE**
 THKLT**FRENAKAKTDHGA**EIVYKSPV**SGDTS**PRHLSNV**SSTGS**IDMVDSP
 QLATLADEV**SASLAKQGL**

SStau186-390

[MKWVTFLLLLFISGSAFSPV]**KSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPP**
TREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLK**NVKSKIGSTENLKHQP**
GGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGG**SVQIVYK**PVDLSKVTSK
CGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVP**GGGNKKIE**
 THKLT**FRENAKAKTDHGA**

SStau296-390

[MKWVTFLLLLFISGSAFSPV]**NIKHVP**GGG**SVQIVYK**PVDLSKVTSK**CGSLG**
NIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVP**GGGNKKIETHKLT**
RENAKAKTDHGA

Figura 5b

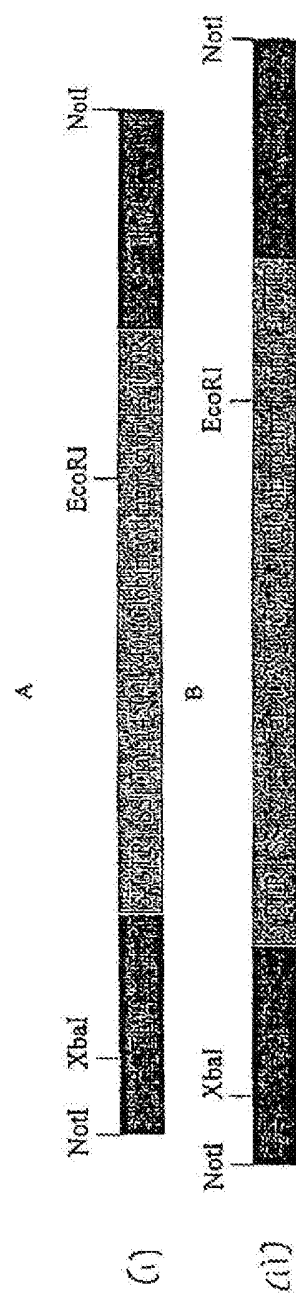
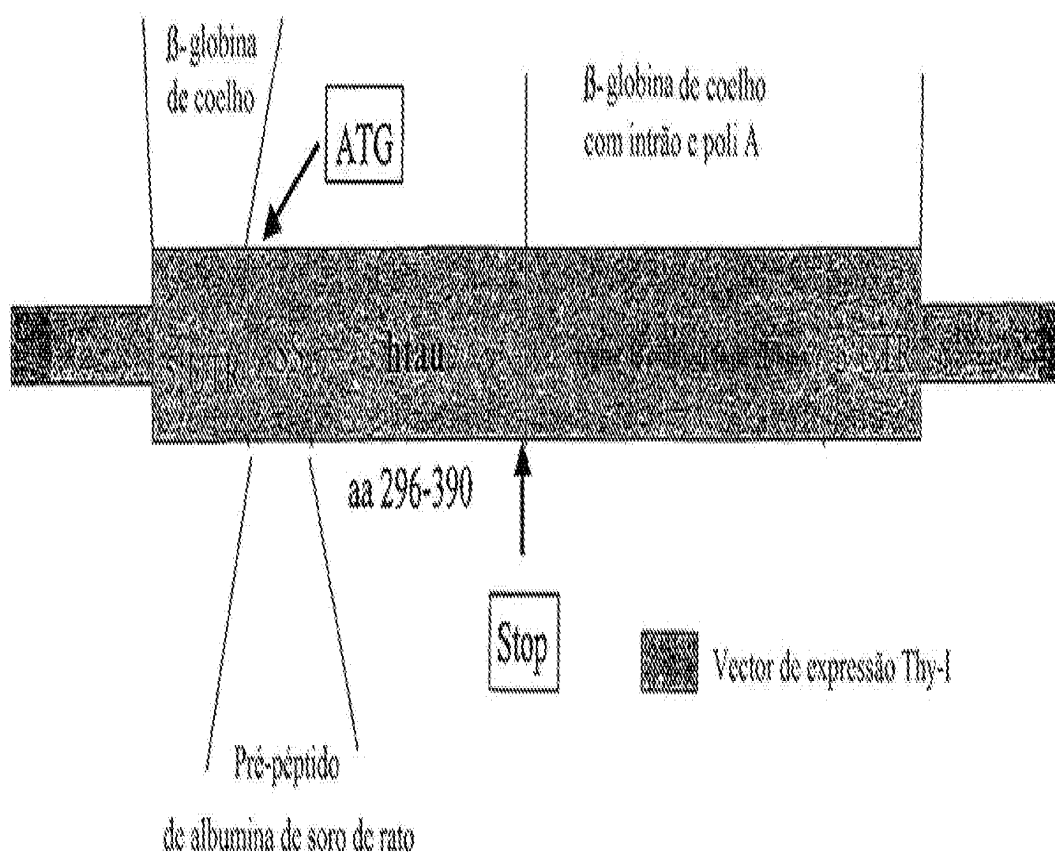


Figura 6a

Construção aa296-390 utilizada para microinjecção de ADN em oócitos fertilizados de ratinhos

Figura 6b



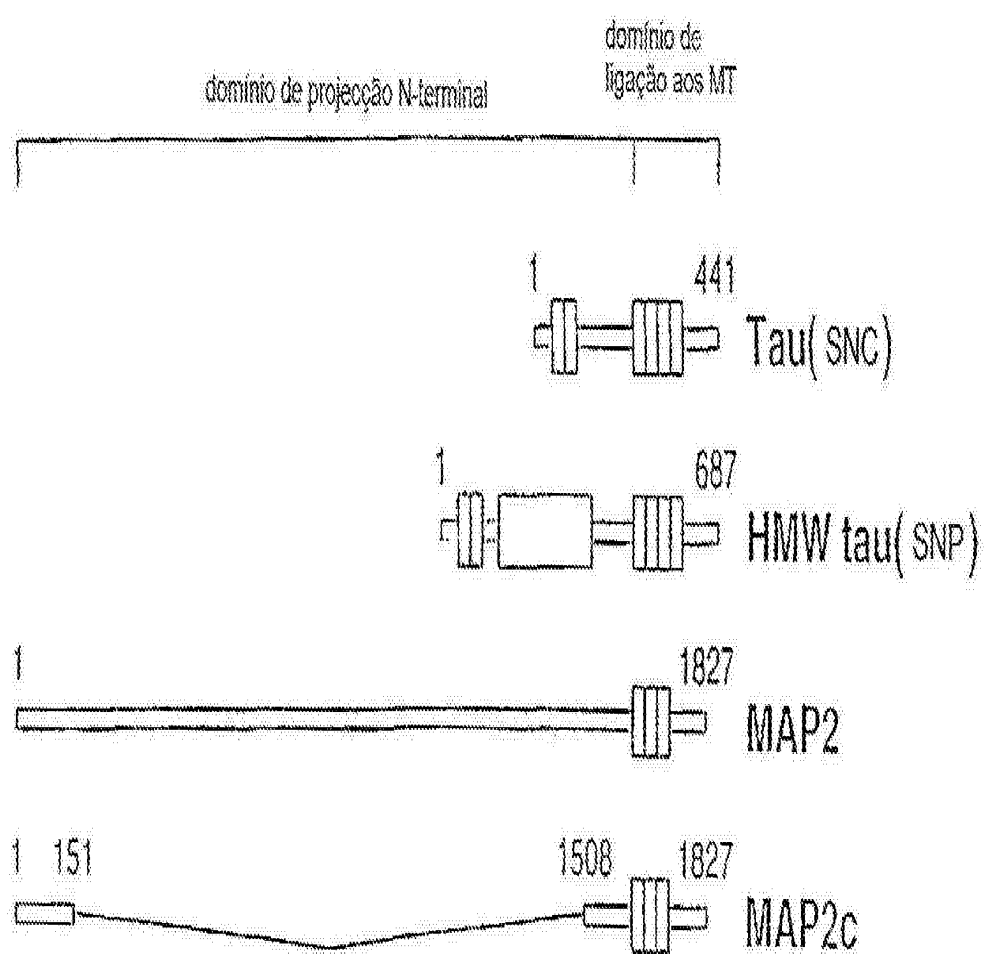


Figura 7

DLKNVKS KIGSTEN tau
D MAP2

↓ ↓

L K H Q P G G G K V Q I I N K K L D L S N V Q S K C G S K D N tau

I Y K Q R L I F K R MAP2

↓ ↓
I K H V P G G G S V Q I V Y K P V D L S K V T S K C G S L G N tau
 S A N T K I H R MAP2

338 340 342
I H H K P G G G Q V E V K S E K L D F K D R V Q S K I G S L D N tau
R R R K I E V EK A V MAP2
* * *

↓
I T H V P G G G N K K I E T H K L t f r e n a k a k t d h g a e tau
 A H V D S Q N H R V MAP2

FILED

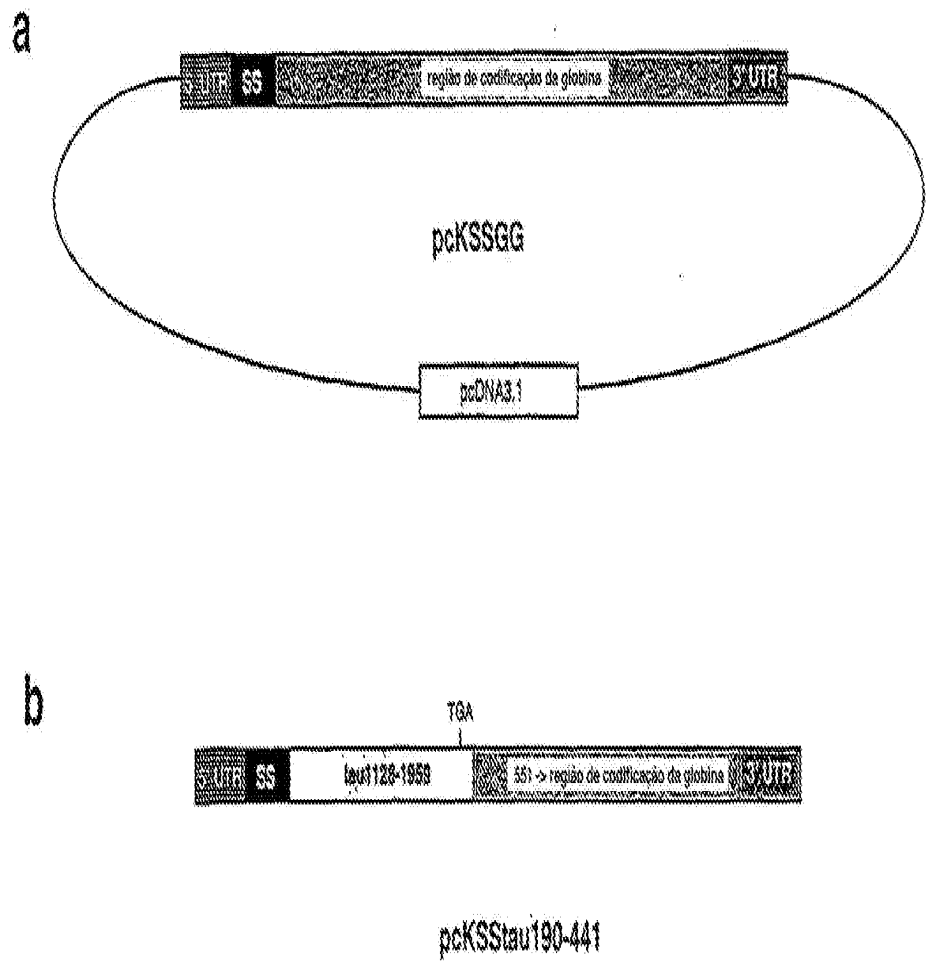


Figura 9

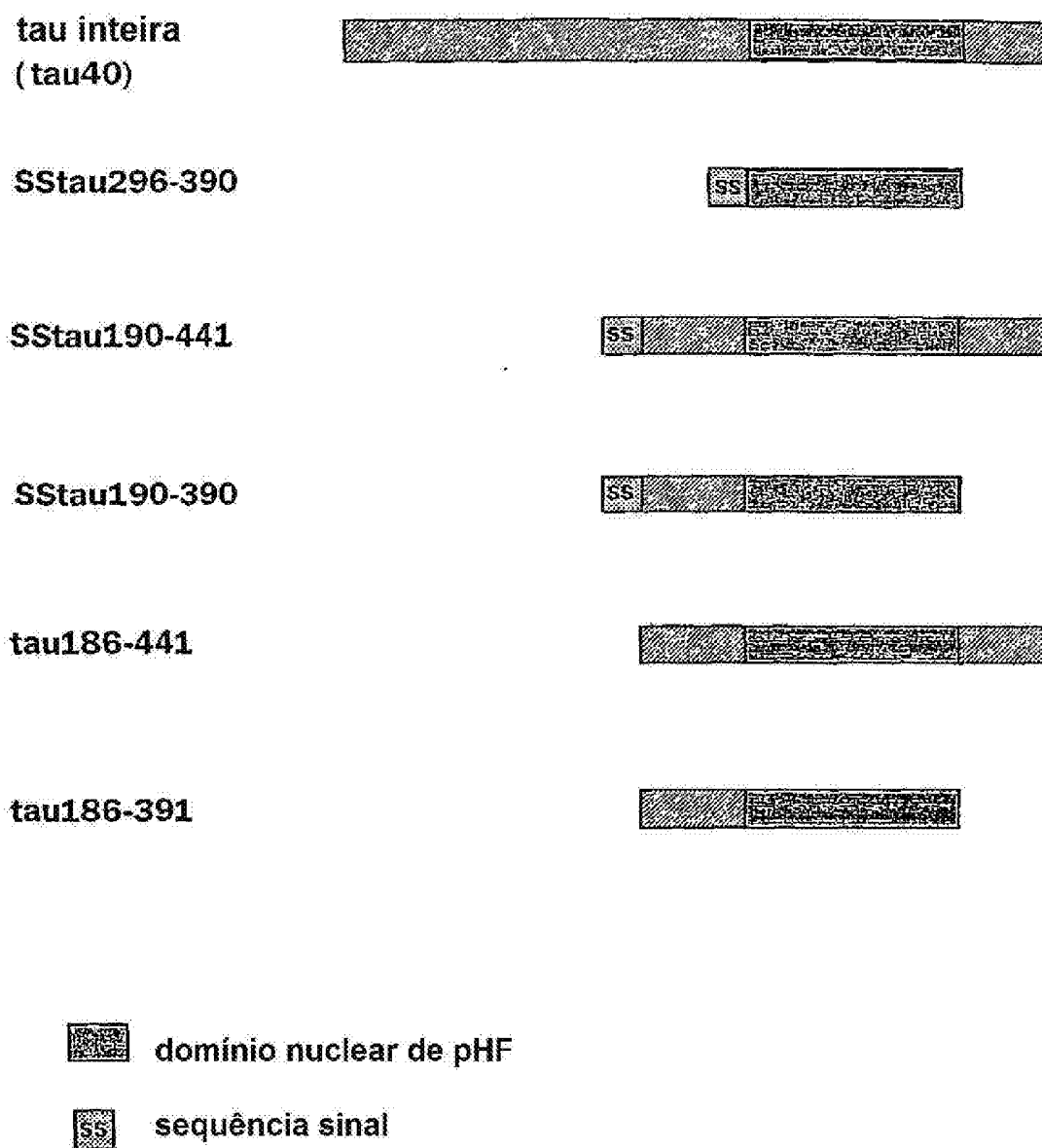


Figura 10

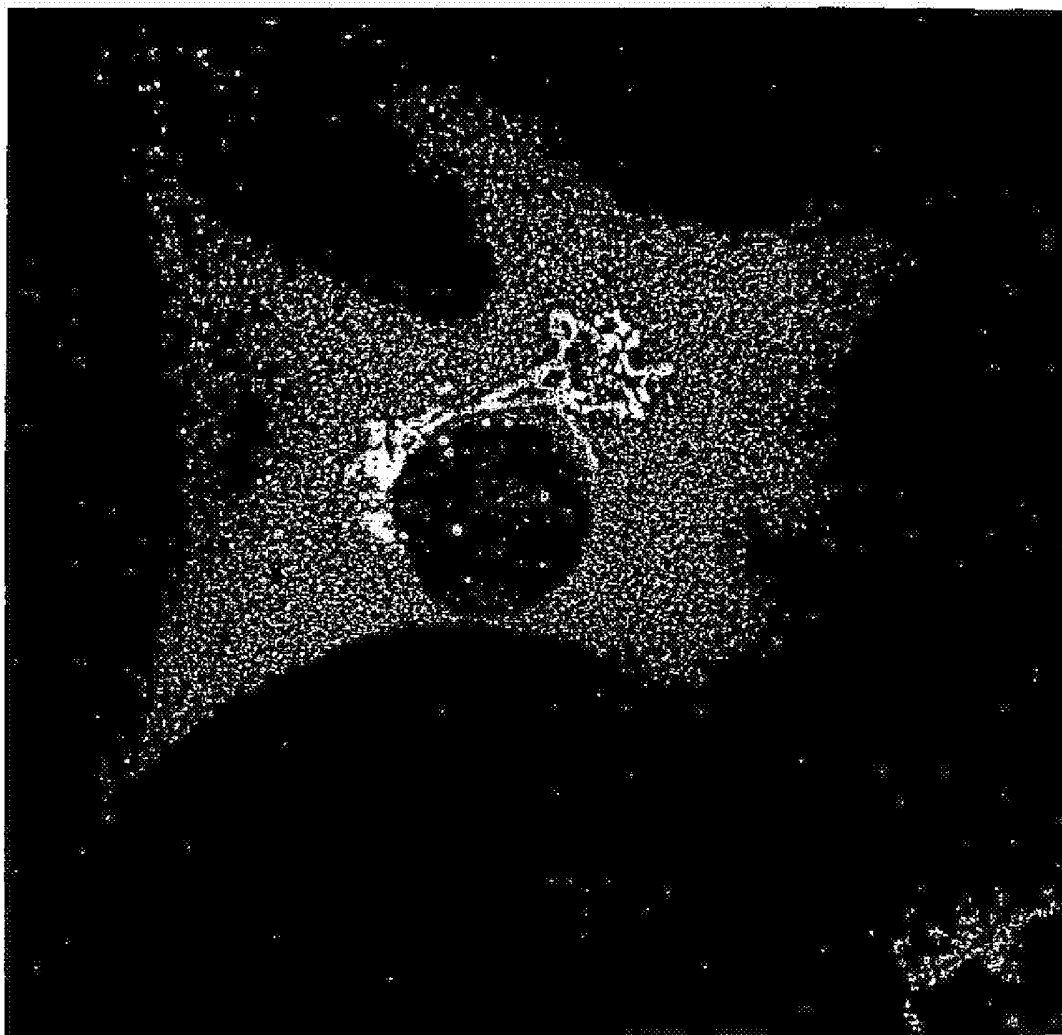


Figura 11

A análise de *Northern blot* da construção aa296-390 (linha 1) mostra um elevado nível de expressão



S26-sonda
(controlo)

Figura 12

**A pré-IP seguida por IP7.51 mostra
uma diferença significativa entre
wt e tg a 12 kDa**

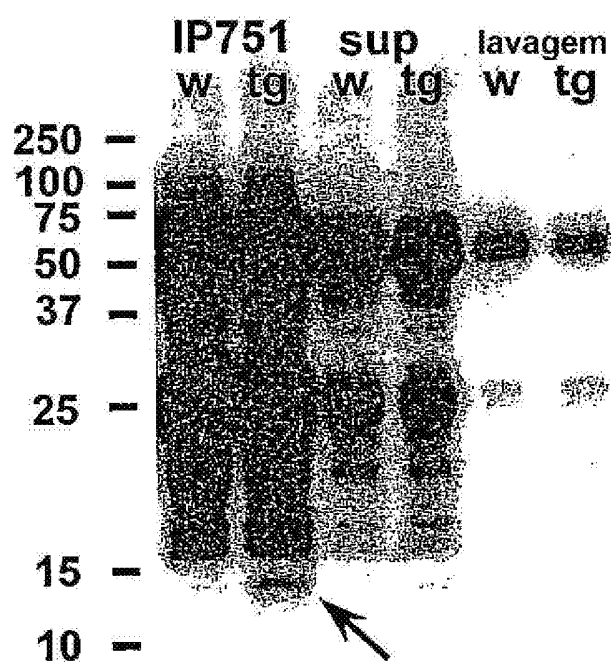


Figura 13

A fracção S1 de três ratinhos diferentes da linha 1 mostram 18 kDa

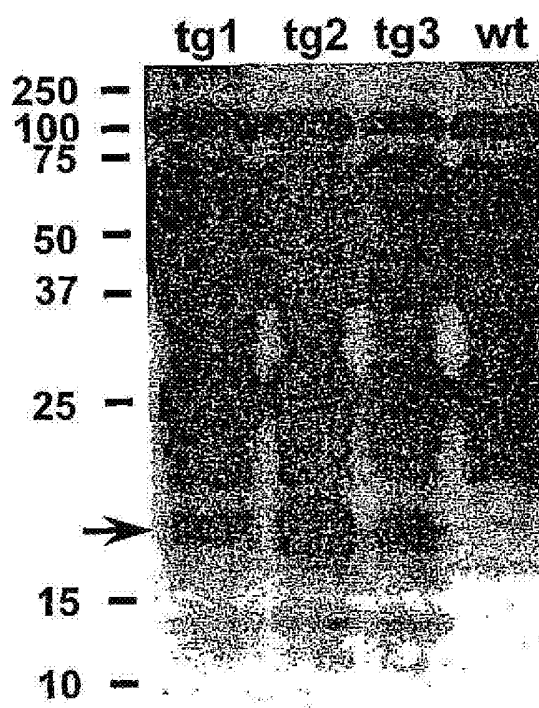


Figura 14

A fracção S1 de três ratinhos diferentes da linha 1 mostram 18 kDa

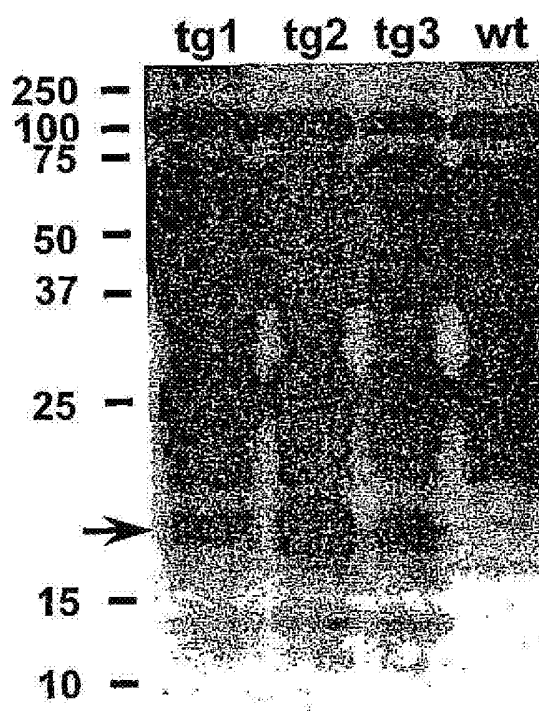


Figura 14

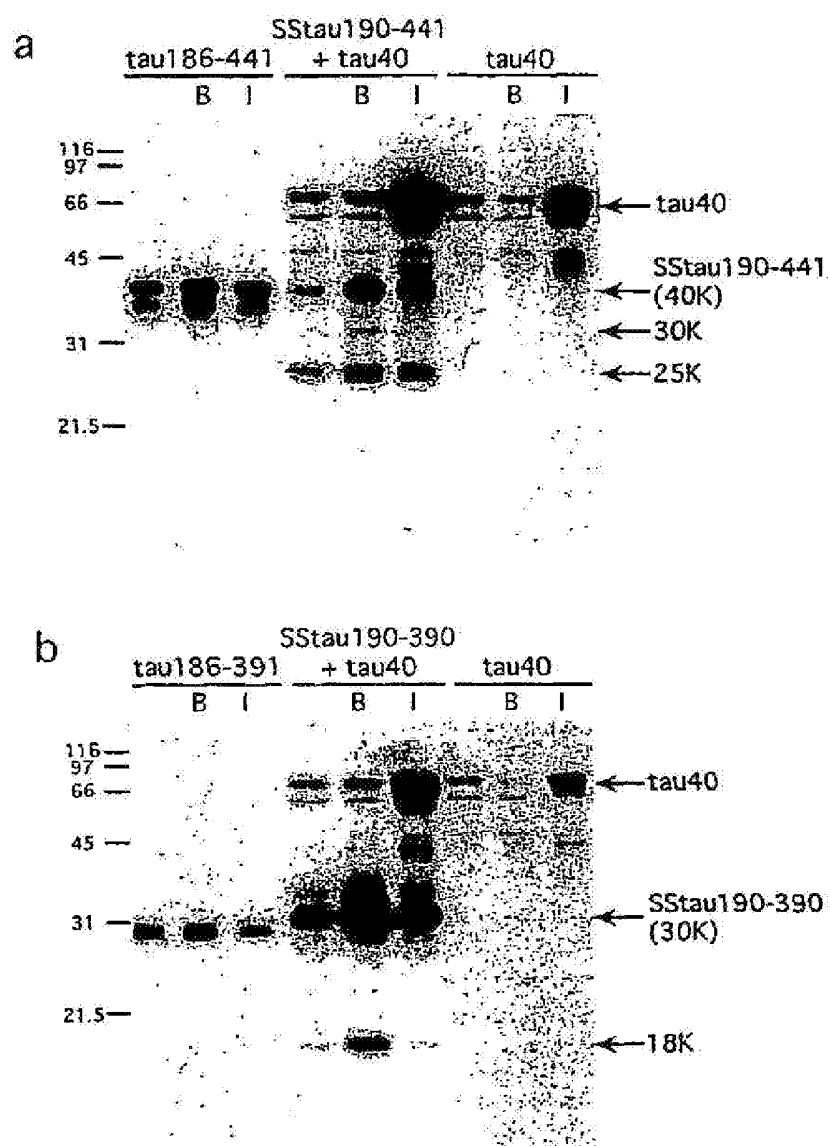


Figura 16a e 16b

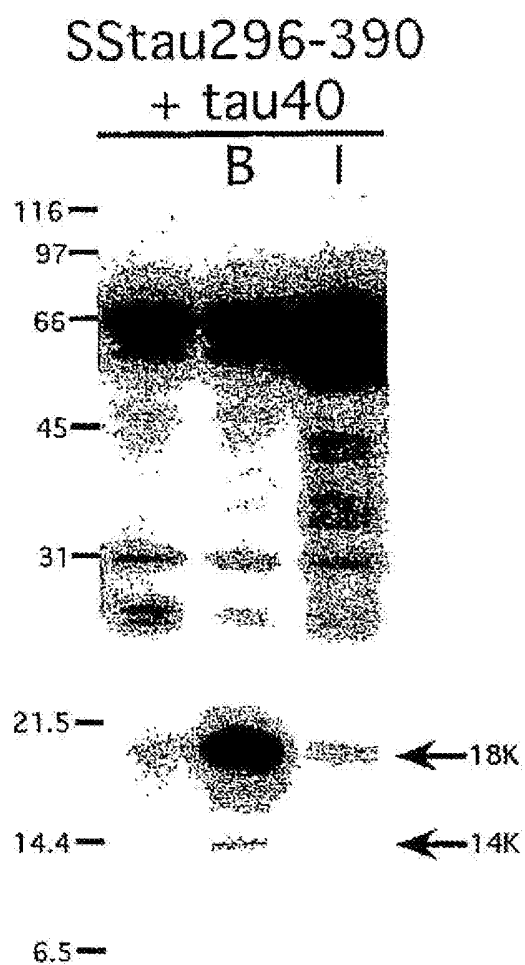


Figura 16c

Agregação *in vitro* de dGAE
expressa em bactérias

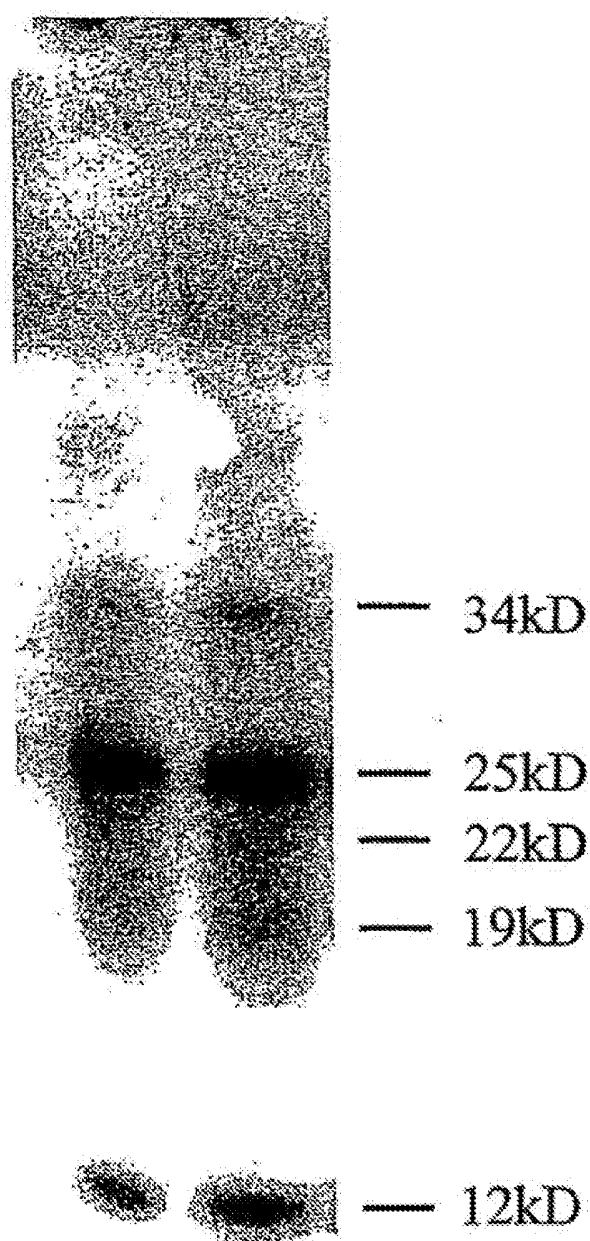


Figura 16d

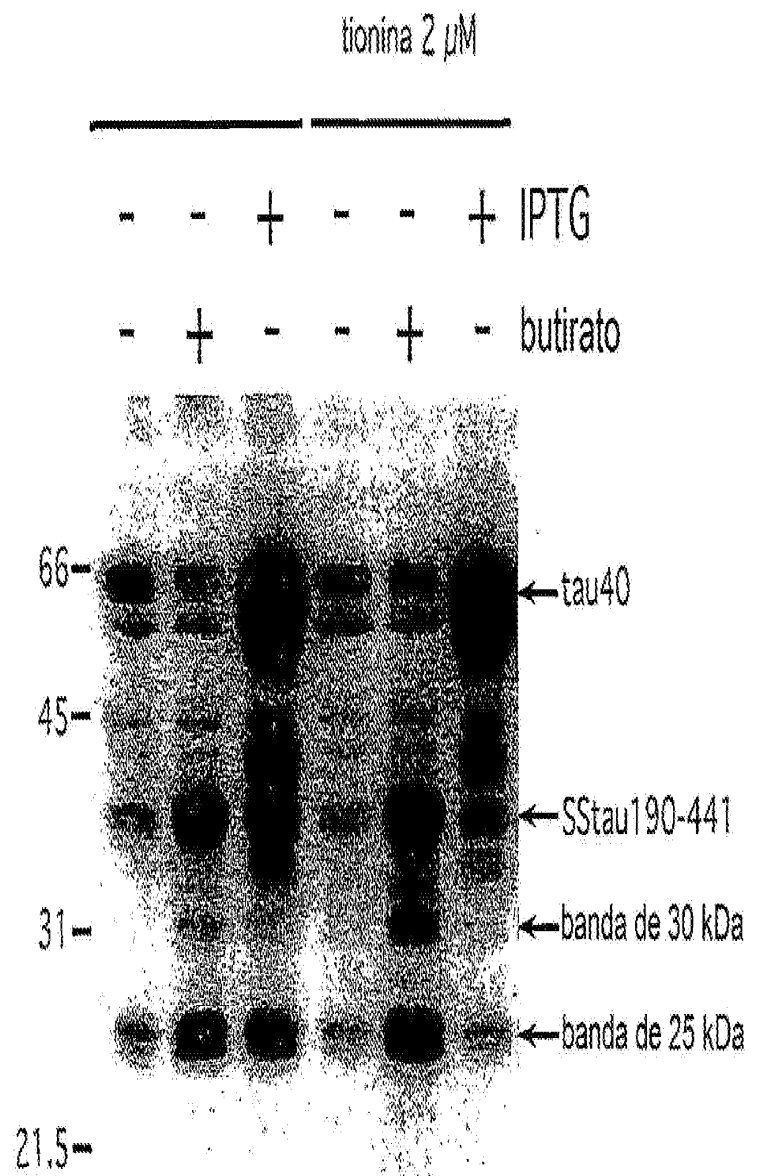
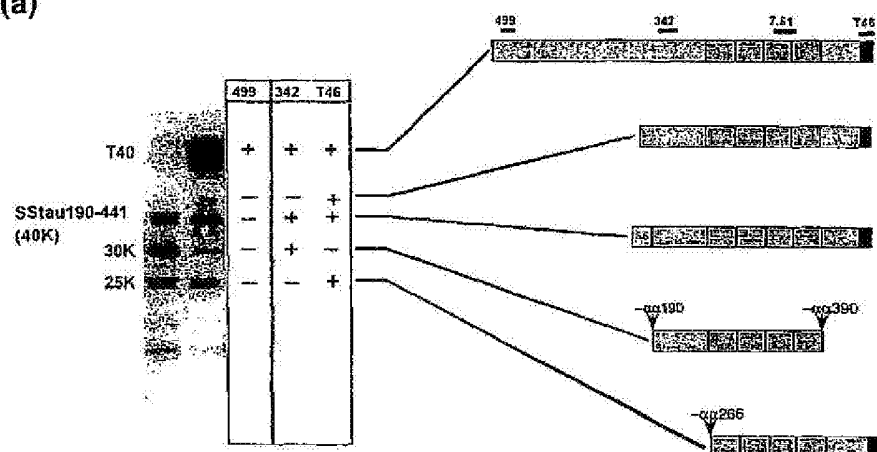


Figura 16c

(a)



(b)

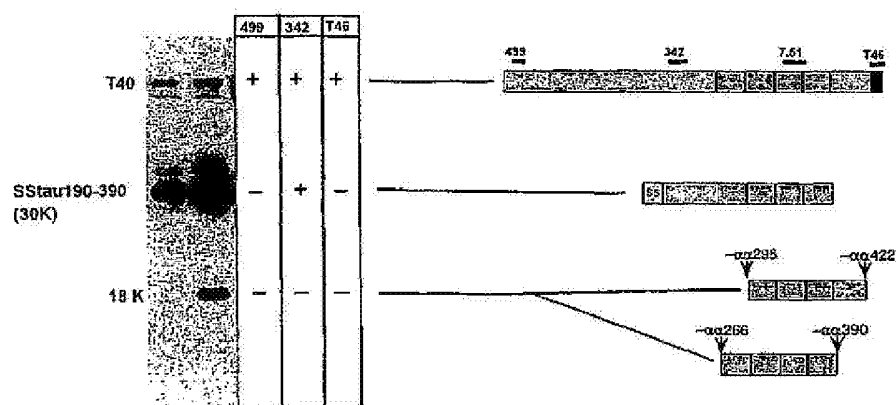


Figura 17

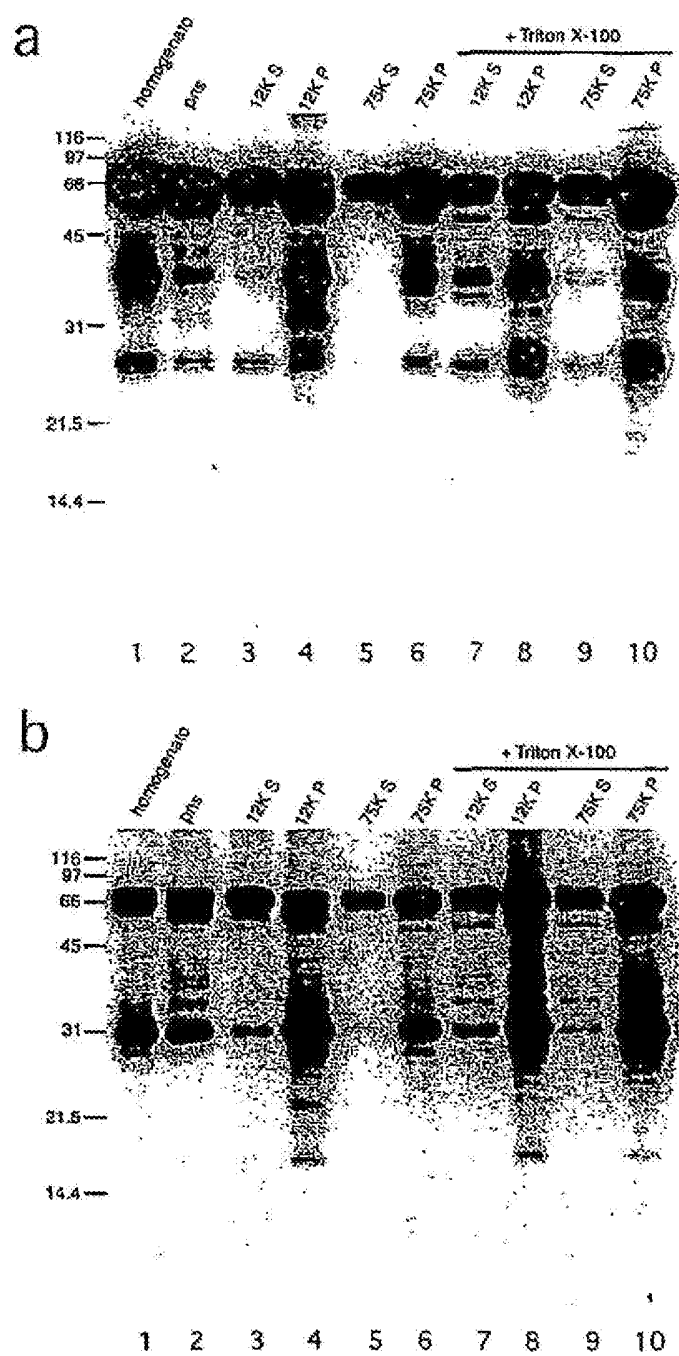
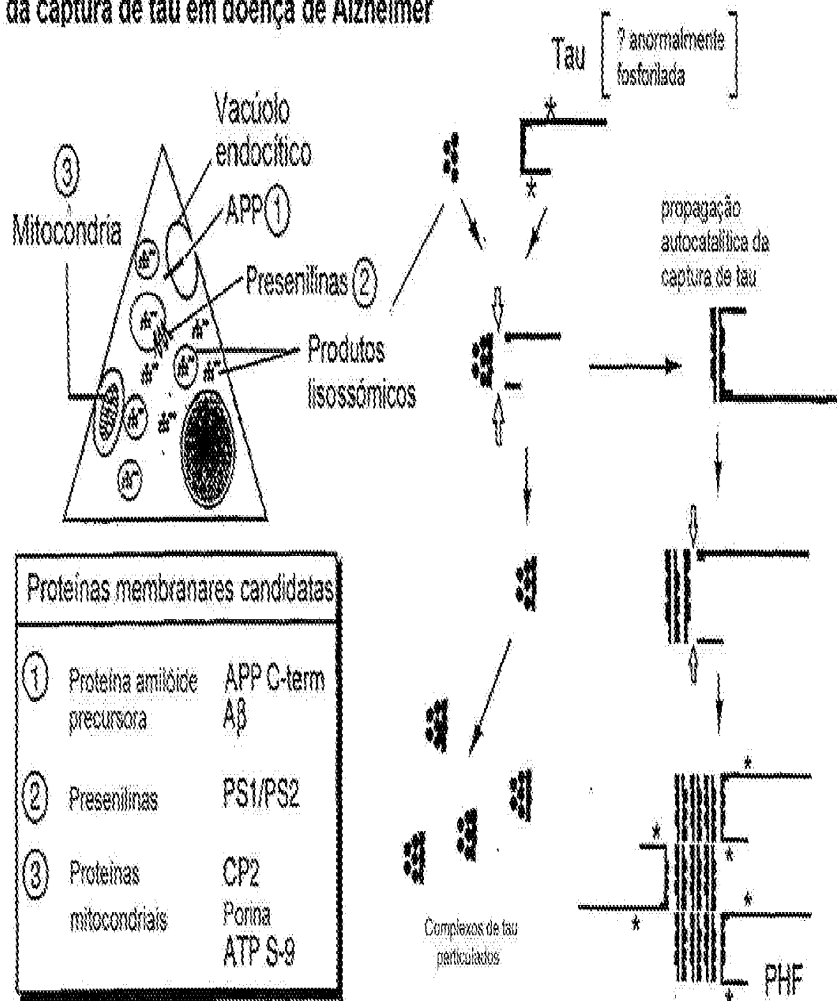


Figura 18

Envolvimento de proteínas membranares no início da captura de tau em doença de Alzheimer

Figura 19a



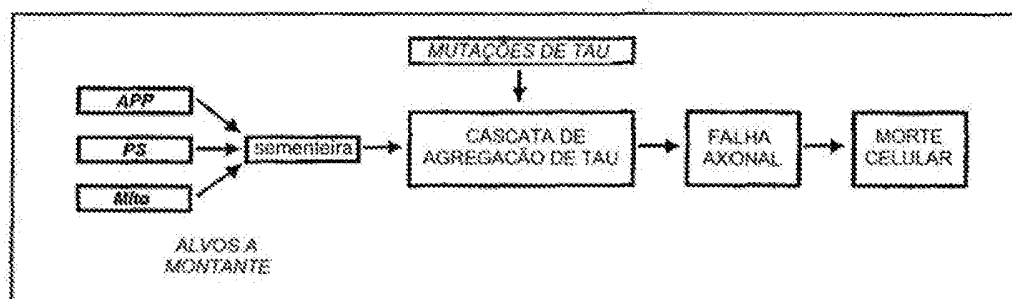


Figura 19b

Doenças de agregação de proteínas

Proteína	Doença	Domínio de agregação e/ou mutações	Tamanho das subunidades de fibrilhas [kDa]	Referência
Distúrbios neurodegenerativos				
Proteína prião	Doenças de priões (CJD, vCJD, Insúmia familiar fatal, Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, BSE)	Formas hereditárias e esporádicas PrP ^{Sc} 27-30; muitas mutações Domínios fibrillogênicos: 113-120, 178-191, 202-218	33	Prusiner (1998) Gasser et al. (1992)
Proteína tau	Doença de Alzheimer, Síndrome de Down, FTDP-17, CBD, Parkinson pós-encefálico, doença de Pick, Parkinson com complexo de densidade de Guam	Formas esporádicas e hereditárias Tau truncada (domínio de ligação à tubulina) 297-391 Mutações em tau em FTDP-17 Muitas mutações em proteínas preamilinares	10-12	Wisnick et al. (1998) Hilton et al. (1999) Crech et al. (2000)
Proteína β -amiloide	Doença de Alzheimer, Síndrome de Down	Formas esporádicas e hereditárias Proteína β -amiloide: 1-42(3); 11 mutações em APP em famílias raras	4	Glenner & Wong (1984) Goate et al. (1991)
Huntingtina	Doença de Huntington	Terminal N de proteína com repetições de glutamina expandidas	40	DiFiglia et al. (1997)
Ataxinas (1, 2, 3, 7)	Ataxias espinocerebelares (SCA1, 2, 3, 7)	Proteínas com repetições de glutamina expandidas		Paulson et al. (2000)
Atrofina	Atrofia dentarobulbopontina (DRPLA)	Proteínas com repetições de glutamina expandidas		Paulson et al. (2000)
Receptor de androgênio	Atrofia espinhal e muscular bulbar	Proteínas com repetições de glutamina expandidas		Paulson et al. (2000)
Neuroserpina	Encefalopatia familiar com corpos de inclusão nervosa (FENIB)	Neuroserpina; S42P, S52R	57	Davis et al. (1999)
α -Sinucleína	Doença de Parkinson, demência com corpos de Lewy, atrofia de múltiplos sistemas	Formas hereditárias e esporádicas A53T, A30 em famílias com DP autosômica dominante rara	19	Spillantini et al. (1995) Polymeropoulos et al. (1997)
Cistatina C	Angiopatia cerebral hereditária (Islandesa)	Cistatina C menos 10 resíduos, L68Q	12-13	Abrahamson et al. (1992)
Superóxido-dismutase 1	Esclerose lateral amiotrófica	Mutações de SOD1		Shibata et al. (1992)
Distúrbios não neurodegenerativos				
Hemoglobina	Anemia de células falciformes	Cadeia beta da hemoglobina (H)		Carrall & Cooper (1998)
Serpinas	Deficiência de α_1 -antitripsina	Mutações		Lowas et al. (1992)

Figura 20 cont...

	(enfisema, cirrose)			Carrell & Gooptu (1998)
	Deficiência antitrombina (doença tromboembólica)	Mutações		Carrell & Gooptu (1998)
	Deficiência de inibidor da C1 (angioedema)	Mutações		
Cadeia leve imunoglobulina	Discrasias de células plasmáticas (amiloidose AL sistêmica primária)	Cadeia leve ou fragmentos	0,5-25	Westermarck et al. (1985)
Amilóide A sérica	Amiloidose AA reactiva, secundária sistêmica Doença inflamatória crônica	Fragmentos N-terminais variáveis de SAA	4,5-20	Westermarck et al. (1985)
Transtiretina	Polineuropatia amilóide familiar (sistêmica; FAP I)	Tetramero dissociado na variante conformacional monomérica Muitas mutações (algumas não associadas a amilóide; vários tipos diferentes de doença)	10-14	Gustavsson et al. (1991)
Gelsolina	Amiloidose cardíaca senil Amiloidose familiar - Tipo finlandês (FAP IV)	Transtiretina normal D187Q conduz a 173-225/243 (resíduos críticos 182-192)	9,5	Gustavsson et al. (1991) Maury & Baumann (1990)
β 2-Microglobulina	Amiloidose da hemodiálise Amilóide prostática	Microglobulina β 2	12-25	Gorevic et al. (1985)
Apolipoproteína A1	Polineuropatia amilóide familiar (sistêmica; FAP III)	resíduos N-terminais 83-93; G26R, W50R, L60R	9	Booth et al. (1995)
Lisozima	Amiloidose visceral familiar	Lisozima ou fragmentos (com ou sem I56T, D67B)	14	Pegys et al. (1993)
Amilina (polipéptido amilóide dos ilhéus)	Diabetes de tipo II (NIDDM)	Fragmentos (núcleo crítico de 20-29); sem mutações	3,9	Westermarck et al. (1990)
Cadeia α do fibrinogênio	Amiloidose renal hereditária	Fragmentos de fibrinogênio	7-10	Demichl et al. (1994)
Procalcitonina	Carcinoma medular da tireóide	Fragmentos de calcitonina	3,4	Slatten et al. (1976)
Factor natriurético auricular	Amiloidose cardíaca	ANF, sem mutantes	3,5	Johansson et al. (1987)
Insulina	Amiloidose de injeção localizada	Insulina		Dische et al. (1988)
Outras proteínas formadoras de amilóide	(in vitro)	Outras proteínas		Chiti et al. (1999)

