

(11) Número de Publicação: **PT 2121754 E**

(51) Classificação Internacional:

**C07K 16/18** (2015.01) **A61K 39/395** (2015.01)  
**A61K 47/48** (2015.01) **C12N 15/13** (2015.01)  
**A61P 25/28** (2015.01)

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

---

(22) Data de pedido: **2008.01.09**

(30) Prioridade(s): **2007.01.18 US 885439 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2009.11.25**

(45) Data e BPI da concessão: **2015.02.11**  
**090/2015**

(73) Titular(es):

**ELI LILLY AND COMPANY**  
**LILLY CORPORATE CENTER, INDIANAPOLIS**  
**INDIANA 46285** **US**

(72) Inventor(es):

**RONALD BRADLEY DEMATTOS** **US**  
**UMA KUCHIBHOTLA** **US**  
**JIRONG LU** **US**  
**KELLY RENEE BALES** **US**  
**THOMAS FRANK BUMOL** **US**

(74) Mandatário:

**ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS**  
**RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA** **PT**

(54) Epígrafe: **FAB DE BETA-AMILÓIDE PEGUILADO**

(57) Resumo:

É DESCRITO UM MÉTODO PARA TRATAR CONDIÇÕES ASSOCIADAS À ACTIVIDADE DO PÉPTIDO ASS TANTO PROFILACTICAMENTE COMO TERAPEUTICAMENTE. O MÉTODO EMPREGA FRAGMENTOS DE ANTICORPO HUMANO QUE SE LIGAM ESPECIFICAMENTE AO PÉPTIDO ASS HUMANO ENTRE AS POSIÇÕES DE AMINOÁCIDOS 13-28, EM QUE OS FRAGMENTOS DE ANTICORPO SÃO COVALENTEMENTE LIGADOS A UMA MOLÉCULA DE POLIETILENOGLICOL (PEG).

**RESUMO**

**"FAB DE BETA-AMILÓIDE PEGUILADO"**

É descrito um método para tratar condições associadas à actividade do péptido Ass tanto profilacticamente como terapeuticamente. O método emprega fragmentos de anticorpo humano que se ligam especificamente ao péptido Ass humano entre as posições de aminoácidos 13-28, em que os fragmentos de anticorpo são covalentemente ligados a uma molécula de polietilenoglicol (PEG).

**DESCRIÇÃO****"FAB DE BETA-AMILÓIDE PEGUILADO"**

O presente invento refere-se a um fragmento de anticorpo que se liga ao péptido beta-amilóide ( $A\beta$ ) e é covalentemente ligado a uma ou mais moléculas de polietileenglicol (PEG).

O péptido  $A\beta$  na forma em circulação é composto por 39-43 aminoácidos (principalmente 40 ou 42 aminoácidos) resultantes da clivagem de uma proteína precursora, a proteína precursora de amilóide (APP). A conversão de  $A\beta$  de formas solúveis em insolúveis com elevado teor de folha  $\beta$  e a sua deposição como placas neuríticas e cerebrovasculares no cérebro parecem estar associadas a várias condições e doenças, incluindo a doença de Alzheimer, a síndrome de Down e a angiopatia amilóide cerebral (CAA). A prevenção e/ou reversão da deposição de  $A\beta$  pode tratar condições associadas ao péptido  $A\beta$ .

Agentes terapêuticos que afectam a deposição de  $A\beta$  incluem anticorpos para o péptido  $A\beta$ , tais como os anticorpos humanizados e fragmentos discutidos em WO 2001/62801, WO 2004/071408 e Tamura, Y., et al., *Neurobiol. of Dis.* (2005) 20: 541-545.

US 2006/257396A divulga anticorpos humanizados que são específicos para beta-amilóide humano ( $A\beta$ ) e descreve a PEGilação destes anticorpos ou fragmentos para prolongar a sua vida.

WO 2004/071408 ensina variantes humanizadas do anticorpo monoclonal de murídeo 266 para o tratamento da doença de Alzheimer.

Chapman, Andrew P: "PEGylated antibodies and antibody fragment for improved therapy: A review", 20020617, vol. 54, no. 54, no. 4, 17 de Junho de 2002 (2002-06-17), páginas 531-545, XP001199533, descreve os benefícios da PEGilação de anticorpos.

WO 2006/040153A divulga nanocorpos que se ligam a  $A\beta$  e estes podem ser PEGuilados através da ligação de uma molécula de PEG à cadeia pesada.

Embora muitos anticorpos e seus derivados possam ser úteis em diagnóstico e terapia, a farmacocinética ideal dos anticorpos não é frequentemente alcançada durante uma aplicação particular. Anticorpos terapêuticos que visam combater várias condições e doenças associadas ao péptido  $A\beta$  são geralmente imunoglobulinas com regiões Fc intactas. As regiões Fc são responsáveis por prolongar a semivida dos anticorpos no plasma. Este prolongamento pode, no entanto, ser uma desvantagem uma vez que evita que o anticorpo que está ligado ao péptido alvo seja eficazmente eliminado,

resultando no complexo antigénio-anticorpo estar presente em circulação no plasma durante longos períodos de tempo. A administração subsequente do anticorpo conduz a uma maior acumulação do complexo indesejado no plasma. A porção Fc de um anticorpo pode ter certas funções efectoras indesejadas e pode precisar de ser modificada para eliminar essas funções. Além disso, a porção Fc acrescenta tamanho substancial ao produto terapêutico global o que muitas vezes cria problemas associados à via de distribuição, a dispositivos de distribuição e a processos de aumento da escala de fabrico.

Fragmentos de anticorpo, sem uma porção Fc, incluindo Fab, foram estudados *in vivo* para determinar se tais fragmentos podem ser potenciais terapêuticos. Estudos sugerem, no entanto, que a utilidade de terapias envolvendo fragmentos tais como Fab é limitada devido a uma velocidade de depuração rápida e uma semivida curta. Portanto, existe a necessidade de uma molécula terapêutica activa de anticorpo anti-péptido A $\beta$  com uma farmacocinética e farmacodinâmica que permitam um regime de dosagem melhorado ao mesmo tempo que evitam potenciais efeitos secundários que possam ser criados pela formação do complexo no plasma e potenciais funções efectoras.

O presente invento ultrapassa vários problemas associados a anticorpos ou fragmentos de anticorpo terapêuticos que podem ser direcionados para o péptido A $\beta$ . Os compostos do presente invento englobam um fragmento de

anticorpo que se liga a A $\beta$  e se liga covalentemente a uma ou mais moléculas de polietilenoglicol (PEG). Estes compostos podem ser produzidos em sistemas de células bacterianas ou de levedura que eliminam várias questões associadas à produção de anticorpos em linhas celulares de mamífero, tais como questões de custo, questões de purificação, e questões de抗igénios contaminantes produzidos endogenamente. Além disso, os compostos do presente invento podem ser administrados por via subcutânea e têm um perfil ideal de farmacocinética (FC) e farmacodinâmica (FD), conservando simultaneamente a afinidade e selectividade do fragmento de anticorpo para A $\beta$ .

De forma bastante imprevisível e inesperada, os requerentes verificaram também que a ligação covalente de moléculas de PEG à região determinante de complementaridade (CDR) do fragmento de anticorpo não alterou a actividade, afinidade ou selectividade do fragmento de anticorpo para A $\beta$ .

Este invento proporciona uma molécula compreendendo um fragmento de anticorpo que se liga especificamente ao péptido A $\beta$  humano entre as posições de aminoácidos 13-28, em que o fragmento de anticorpo está ligado covalentemente a uma molécula de PEG.

De acordo com o presente invento, é proporcionada uma molécula compreendendo um fragmento de anticorpo Fab que se liga especificamente ao péptido A $\beta$  humano entre as

posições de aminoácidos 13 a 28, em que o fragmento de anticorpo comprehende uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 1 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 2, e em que o referido fragmento de anticorpo Fab está covalentemente ligado a uma molécula de polietilenoglicol de 20 kDa na cisteína no aminoácido 56 de SEQ ID NO: 2. De preferência, a molécula de polietilenoglicol está ligada através de uma ligação maleimida.

De acordo com outro aspecto do presente invento, é proporcionada uma molécula de acordo com o presente invento para utilização como medicamento. De preferência, a molécula é para utilização no tratamento ou na prevenção de uma condição associada a actividade do péptido A $\beta$ .

De maior preferência, a molécula de acordo com o presente invento é para utilização no tratamento ou na prevenção de uma condição seleccionada a partir de doença de Alzheimer, síndroma de Down e angiopatia amilóide cerebral (CAA).

Ainda de maior preferência, a molécula de acordo com o presente invento é para utilização no tratamento ou na prevenção de doença de Alzheimer pré-clínica.

Alternativamente, a molécula de acordo com o presente invento é para utilização no tratamento ou na prevenção de doença de Alzheimer clínica.

De acordo com um outro aspecto do presente invento, é proporcionada uma composição compreendendo a molécula do presente invento. De preferência, a composição compreende um suporte farmaceuticamente aceitável e é adequada para administração subcutânea.

Numa concretização, a divulgação proporciona uma molécula compreendendo um fragmento de anticorpo que possui uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que uma região variável de cadeia leve compreende regiões CDR com as seguintes sequências de aminoácidos: CDRL1: **SSSQSLIYSDGNAYLH** (SEQ ID NO: 6), CDRL2: **KVSNRFS** (SEQ ID NO: 7) e CDRL3: **TQSTHSPWT** (SEQ ID NO: 8) e em que a região variável de cadeia pesada compreende regiões CDR com as seguintes sequências de aminoácidos: CDRH1: **GYTFSRYSMS** (SEQ ID NO: 9), CDRH2: **QINIRGCNTYYPDTVKG** (SEQ ID NO: 10) ou **QINIRGNNTYYPDTVKG** (SEQ ID NO: 11), e CDRH3: **GDF** (SEQ ID NO: 12). De preferência, uma tal molécula tem uma molécula de PEG que está covalentemente ligada à região variável de cadeia pesada ou à região variável de cadeia leve do fragmento de anticorpo. De maior preferência, uma tal molécula possui uma molécula de PEG que está covalentemente ligada a uma CDR. Ainda de maior preferência, uma tal molécula possui uma molécula de PEG que está covalentemente ligada a um resíduo de cisteína dentro da CDR. De maior preferência, uma tal molécula possui uma molécula de PEG que está covalentemente ligada a uma CDRH2: **QINIRGCNTYYPDTVKG** (SEQ ID NO: 10) da região variável de cadeia pesada do fragmento de anticorpo.

Noutra concretização, a divulgação proporciona uma molécula compreendendo um fragmento de anticorpo que possui uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 1, e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 2. De preferência, uma tal molécula possui uma molécula de PEG que está covalentemente ligada à região variável de cadeia pesada ou à região variável de cadeia leve do fragmento de anticorpo. De maior preferência, uma tal molécula possui uma molécula de PEG que está covalentemente ligada a uma CDR de uma região variável de cadeia pesada do fragmento de anticorpo. Ainda de maior preferência, uma tal molécula possui uma molécula de PEG que está covalentemente ligada a um resíduo de cisteína dentro da CDR de uma região variável de cadeia pesada do fragmento de anticorpo. De maior preferência, uma tal molécula possui uma molécula de PEG que está covalentemente ligada à cisteína na posição de aminoácido 56 da região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 2.

Noutra concretização, a divulgação proporciona uma molécula compreendendo um fragmento Fab ou um fragmento ScFv, em que o fragmento Fab ou fragmento ScFv está covalentemente ligado a uma molécula de PEG e possui uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 1, e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 2. De preferência, uma tal molécula possui uma molécula de PEG que está covalentemente ligada à cisteína na posição de aminoácido 56 da região variável de cadeia pesada de SEQ ID

NO: 2. Também de preferência, numa tal molécula o peso molecular do PEG é de cerca de 0,5 kDa a cerca de 30 kDa, de maior preferência 20 kDa.

Noutra concretização, a divulgação proporciona uma molécula compreendendo um fragmento de anticorpo com uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 1 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 2, em que o referido fragmento de anticorpo está covalentemente ligado a uma molécula de PEG de 20 kDa na posição 56 da região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 2. De preferência, numa tal molécula a molécula de PEG está ligada covalentemente através de uma ligação maleimida.

Noutra concretização, a divulgação proporciona uma molécula compreendendo um fragmento de anticorpo que se liga especificamente ao péptido A $\beta$  humano entre as posições de aminoácidos 13-28, em que o fragmento de anticorpo está covalentemente ligado a uma molécula de PEG e possui uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 1, e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 3. De preferência, uma tal molécula possui uma molécula de PEG que está covalentemente ligada à região charneira do fragmento de anticorpo. De maior preferência, o PEG está covalentemente ligado à região charneira através de uma ligação maleimida.

A divulgação inclui também uma molécula compreendendo fragmentos de anticorpos, de preferência fragmentos

de anticorpo humanizados em que a molécula de PEG está covalentemente ligada ao fragmento de anticorpo que resulta numa molécula terapêutica activa com farmacocinética e farmacodinâmica que permite um regime de dosagem semanal, minimizando simultaneamente potenciais efeitos secundários que possam ser criados pela formação do complexo no plasma e conservando ou melhorando a actividade, afinidade e selectividade do fragmento de anticorpo para A $\beta$ .

A divulgação inclui também métodos de tratamento, prevenção, ou reversão de condições e doenças associadas ao péptido A $\beta$ , incluindo tanto doença de Alzheimer pré-clínica como clínica, síndroma de Down, e angiopatia amilóide cerebral pré-clínica e clínica (CAA). Estes métodos compreendem a administração a um sujeito de uma quantidade eficaz de uma molécula aqui descrita e reivindicada.

Esta divulgação proporciona uma molécula comprendendo um fragmento de anticorpo que se liga especificamente ao péptido A $\beta$  entre as posições de aminoácidos 13-28, em que o fragmento de anticorpo está covalentemente ligado a uma molécula de PEG. Verificámos que a ligação covalente da molécula de PEG a um fragmento de anticorpo que se liga a A $\beta$  não alterou negativamente a actividade, afinidade ou selectividade do fragmento de anticorpo para A $\beta$ . Mais surpreendentemente, verificámos que a ligação covalente da molécula de PEG possuindo um peso molecular de até 20 kDa a uma CDR de um fragmento de anticorpo que se liga a A $\beta$  também não alterou negativamente a actividade,

afinidade ou selectividade do fragmento de anticorpo para o péptido A $\beta$ . Estes fragmentos de anticorpo podem ser administrados subcutaneamente e têm um perfil de FC/FD melhorado para utilização terapêutica, suportando um regime de dosagem flexível. Além disso, estes fragmentos de anticorpo podem ser produzidos em sistemas de células bacterianas ou de levedura que eliminam várias questões associadas à produção de anticorpos inteiros em células de mamífero. Os fragmentos de anticorpo peguilados deste invento oferecem a oportunidade de prevenir e tratar, tanto profilacticamente como terapeuticamente, condições em humanos associadas ao péptido A $\beta$ .

Um anticorpo inteiro tal como existe naturalmente é uma molécula de imunoglobulina constituída por quatro cadeias peptídicas, duas cadeias pesadas (H) (cerca de 50-70 kDa quando inteiras) e duas cadeias leves (L) (cerca de 25 kDa quando inteiras) interligadas através de ligações dissulfureto. A porção amino-terminal de cada cadeia inclui uma região variável de cerca de 100-110 ou mais aminoácidos principalmente responsáveis pelo reconhecimento do抗原. A porção carboxi-terminal de cada cadeia define uma região constante principalmente responsável pela função efectora.

As cadeias leves são classificadas como capa ou lambda e caracterizadas por uma região constante específica. Cada cadeia leve é constituída por uma região variável de cadeia leve N-terminal (aqui "LCVR") e uma

região constante de cadeia leve constituída por um domínio, CL. As cadeias pesadas são classificadas como gama, mu, alfa, delta, ou épsilon, e definem o isotipo do anticorpo como IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, respectivamente, e vários destes podem ser ainda divididos em subclasses (isotipos), e.g., IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>. Cada tipo de cadeia pesada é caracterizado por uma região constante particular. Cada cadeia pesada é constituída por uma região variável de cadeia pesada N-terminal (aqui "HCVR") e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada é constituída por três domínios (CH1, CH2, e CH3) para IgG, IgD, e IgA; e 4 domínios (CH1, CH2, CH3, e CH4) para IgM e IgE.

As regiões HCVR e LCVR podem ainda ser subdivididas em regiões de hipervariabilidade, designadas regiões determinantes de complementaridade ("CDR"), intercaladas com regiões que são mais conservadas, designadas por regiões estruturais ("FR"). Cada HCVR e LCVR é composta por três CDR e quatro FR, dispostas do terminal amino para o terminal carboxilo na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Aqui, as 3 CDR da cadeia pesada são referidas como "CDRH1, CDRH2, e CDRH3" e as 3 CDR da cadeia leve são referidas como "CDRL1, CDRL2 e CDRL3". As CDR contêm a maioria dos resíduos que formam interacções específicas com o antigénio. A numeração e o posicionamento dos resíduos de aminoácidos das CDR dentro das regiões HCVR e LCVR está de acordo com a bem conhecida convenção de numeração de Kabat.

A região variável de cada par de cadeias leves pesada forma um local de ligação ao antigénio do anticorpo. Tal como aqui utilizado, a "porção de ligação ao antigénio" ou "região de ligação ao antigénio" ou "domínio de ligação ao antigénio" ou "local de ligação ao antigénio" refere-se alternadamente à porção de uma molécula de anticorpo que contém os resíduos de aminoácidos que interagem com um antigénio e conferem ao anticorpo a sua especificidade e afinidade para o antigénio. Esta porção do anticorpo inclui os resíduos de aminoácidos "estruturais" necessários para manter a conformação correcta dos resíduos de ligação ao antigénio. De preferência, as regiões estruturais de anticorpos do invento são de origem humana ou substancialmente de origem humana (pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de origem humana) e seguem a numeração de Kabat. Alternativamente, a região ligação ao antigénio pode ser derivada da sequência humana.

Tal como aqui utilizado, o termo "fragmento de anticorpo" refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retêm a capacidade de se ligar especificamente a um antigénio (e.g., A $\beta$ ). Exemplos de moléculas englobadas dentro do termo "fragmento de anticorpo" de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente consistindo nos domínios VL, VH, CL e CH1; (ii) um fragmento F(ab') $_2$ , um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados através de uma ponte dissulfureto na região charneira; (iii) um fragmento Fd

consistindo no domínio VH e CH1; (iv) um fragmento Fv consistindo no domínio VL e VH de um único braço de um anticorpo, e (v) um fragmento dAb (Ward, et al., (1989) *Nature* 341: 544-546), que consiste num domínio VH. Além disso, embora os dois domínios do fragmento Fv, VL e VH, sejam codificados por genes separados, podem ser unidos, utilizando métodos recombinantes, através de um ligador sintético que permita que sejam tornados numa cadeia proteica única, em que a região VL e VH emparelham para formar moléculas monovalentes (conhecidas como Fv de cadeia simples (scFv); Ver, e.g., Bird et al. (1988) *Science* 242: 423-426; e Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883). Pretende-se também que tais anticorpos de cadeia simples estejam englobados no termo "fragmento de anticorpo". Outras formas de anticorpos de cadeia simples tais como diacorpos estão também englobadas pelo termo "fragmento de anticorpo". Os diacorpos são proteínas de ligação bivalentes, biespecíficas em que o domínio VH e VL são expressos numa única cadeia polipeptídica, mas utilizando um ligador que é demasiado curto para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia, forçando assim os domínios a emparelhar com domínios complementares de outra cadeia e criando dois locais de ligação ao抗ígeno (ver, e.g., Holliger, P., et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) *Structure* 2: 1121-1123).

Mais ainda, um anticorpo ou fragmento de anticorpo deste pode ser parte de uma molécula de imunoadesão

maior, formada através de associação covalente ou não covalente do anticorpo ou fragmento de anticorpo com uma ou mais outras proteínas ou péptidos. Exemplos de tais moléculas de imunoadesão incluem a utilização da região nuclear de estreptavidina para produzir uma molécula scFv tetramérica (Kipriyanov, S.M., et al. (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6: 93-101) e utilização de um resíduo de cisteína, um péptido marcador e uma etiqueta de poli-histidina C-terminal para tornar as moléculas scFv bivalentes e biotiniladas (Kipriyanov, S.M., et al. (1994) *Mol. Immunol.* 31: 1047-1058). Fragmentos de anticorpo, tais como fragmentos Fab e F(ab')<sub>2</sub>, podem ser preparados a partir de anticorpos inteiros utilizando técnicas convencionais, tais como digestão com papaina ou pepsina, respectivamente, dos anticorpos inteiros. Além disso, anticorpos, fragmentos de anticorpo e moléculas de imunoadesão podem ser obtidos utilizando técnicas de ADN recombinante padrão, como são bem conhecidos na técnica. Os anticorpos, fragmentos de anticorpo e moléculas de imunoadesão podem ou não ser glicosilados e estar ainda dentro dos limites do invento. De preferência, o fragmento de anticorpo é um fragmento Fab.

O termo "anticorpo humanizado" refere-se a um anticorpo que é constituído parcial ou totalmente por sequências de aminoácidos derivadas de uma linha germinativa de anticorpo humano ou uma sequência rearranjada e produzida alterando a sequência de um anticorpo possuindo CDR não humanas. As regiões estruturais das regiões

variáveis podem ser substituídas pelas regiões estruturais humanas correspondentes. As regiões estruturais humanas incluem regiões estruturais genómicas, bem como aquelas contendo uma ou mais substituições de aminoácidos. Em particular, tais substituições incluem mutações em que um aminoácido numa posição particular na estrutura humana é substituído pelo aminoácido da posição correspondente da estrutura natural para a CDR não humana. Por exemplo, um anticorpo humanizado possuindo CDR de ratinho pode conter uma ou mais substituições que substituam um determinado aminoácido da estrutura humana com o correspondente aminoácido de estrutura de ratinho. As referências descrevendo ainda métodos envolvidos na humanização de um anticorpo de ratinho que pode ser utilizado são e.g., Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2869, 1991; Pat. U.S. No. 5693761; Pat. U.S. No. 4816397; Pat. U.S. No. 5225539; os programas de computador ABMOD e ENCAD tal como descrito em Levitt, M., *J. Mol. Biol.* 168: 595-620, 1983; a humanização pode ser essencialmente realizada seguindo o método de Winter e colegas (Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525, 1986; Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-327, 1988; Verhoeven *et al.*, *Science*, 239: 1534-1536, 1988). De preferência, um anticorpo da divulgação é um fragmento de anticorpo humanizado. De maior preferência, um anticorpo da divulgação é um fragmento de anticorpo Fab humanizado.

A presente divulgação inclui também fragmentos de anticorpo que são covalentemente ligados a uma ou mais moléculas de PEG. Pretende-se que o termo "poli-

etilenoglicol" e "PEG" sejam utilizados alternadamente e referem-se a polietilenoglicol ou a um derivado deste, tal como conhecido na técnica (ver, e.g., Patentes U.S. Nos: 5445090; 5900461; 5932462; 6436386; 6448369; 6437025; 6448369; 6495659; 6515100 e 6514491). De preferência, o PEG está covalentemente ligado a um ou mais resíduos de lisina ou cisteína do fragmento de anticorpo. De maior preferência, o PEG está covalentemente ligado a um ou mais resíduos de lisina ou cisteína na região variável de cadeia pesada do fragmento de anticorpo. Ainda de maior preferência, o PEG está covalentemente ligado a um ou mais resíduos de lisina ou cisteína dentro da CDR do fragmento de anticorpo. De maior preferência, o PEG está ligado a um resíduo de cisteína na posição de aminoácido 56 da região variável de cadeia pesada da referida SEQ ID NO: 2. Alternativamente, as moléculas de PEG podem ser ligadas ao fragmento de anticorpo através de um ligador ou molécula espaçadora à região charneira do fragmento de anticorpo. A adição de ligadores e moléculas espaçadoras às regiões charneira é bem conhecida na técnica. Além disso, um PEG pode ser covalentemente ligado a aminoácidos não naturais modificados do fragmento de anticorpo através de técnicas bem conhecidas na especialidade.

Na sua forma típica, "PEG" é um polímero linear com grupos hidroxilo terminais e tem a fórmula HO-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-OH, em que *n* é de cerca de 8 a cerca de 4000. O hidrogénio terminal pode ser substituído com um grupo protector tal como um grupo alquilo ou alcanol (M-

PEG). De preferência, o PEG tem pelo menos um grupo hidroxilo, de maior preferência é um grupo hidroxilo terminal. É este grupo hidroxilo que é de preferência activado para reagir com o péptido. Uma variedade de modificações químicas é utilizada para preparar um derivado de PEG activo com um grupo funcional, tal como carbonato activo, éster activo, aldeído, tresilato, ou utilizando PEG-propionaldeído adequado para acoplamento a uma dada molécula alvo. O derivado de PEG activado é então ligado covalentemente a um grupo reactivo no fármaco polipeptídico. Existem muitas formas de PEG úteis para o presente invento. Existem muitas formas de PEG úteis para o presente invento. Existem numerosos derivados de PEG na técnica que são adequados para utilização do invento. Não se pretende que a molécula de PEG covalentemente ligada a um fragmento de anticorpo do presente invento esteja limitada a um determinado tipo ou tamanho. O peso molecular do PEG é de preferência de cerca de 0,5 quilodaltons (kD) a cerca de 100 kD e de maior preferência de cerca de 5 kD a cerca de 30 kD e ainda de preferência de cerca de 1 kD a cerca de 20 kD. O PEG pode ser linear ou ramificado e o fragmento de anticorpo anti-péptido A $\beta$  do invento pode ter 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 moléculas de PEG ligadas ao péptido. É preferível que haja uma molécula de PEG por fragmento de anticorpo; no entanto, quando está presente mais do que uma molécula de PEG por molécula de péptido, é preferido que não haja mais do que seis. Está ainda contemplado que ambas as extremidades da molécula de PEG possam ser adaptadas para reticulação de duas ou mais moléculas de fragmento de

anticorpo anti-péptido A $\beta$  umas com as outras. Os métodos de ligação de moléculas de PEG a proteínas, anticorpos e fragmentos destes, são bem conhecidos na técnica.

O termo " $K_D$ ", tal como aqui utilizado, destina-se a referir a constante de dissociação de uma determinada interacção anticorpo-antigénio. É calculada pela fórmula:

$$K_D = K_{off}/K_{on} \text{ (medida em M)}$$

O termo " $k_{on}$ " tal como aqui utilizado destina-se a referir a constante de velocidade de associação, ou a velocidade de reacção específica, da reacção directa, ou de formação de complexo, medida em unidades:  $M^{-1}s^{-1}$ . O termo " $k_{off}$ ", tal como aqui utilizado, destina-se a referir a constante de velocidade de dissociação, ou velocidade de reacção específica, para a dissociação de um anticorpo do complexo anticorpo/antigénio, medida em unidades:  $s^{-1}$ .

O termo "liga-se especificamente" tal como aqui utilizado refere-se à situação em que um membro de um par de ligação específica não se liga significativamente a outras moléculas além do ou dos seus parceiros de ligação específica. O termo também é aplicável quando, e.g., um domínio de ligação ao antigénio de um anticorpo do invento é específico para um determinado epitopo que é transportado por vários antigénios, caso em que o anticorpo específico transportando o domínio de ligação ao antigénio será capaz de se ligar aos vários antigénios transportadores do

epitopo. Concordantemente, uma molécula do invento liga-se especificamente ao péptido A $\beta$  ao mesmo tempo que não se liga especificamente a APP. Além disso, uma molécula do invento liga-se especificamente entre um epitopo linear, não linear ou conformacional de A $\beta$  compreendendo os aminoácidos HHQKLVFFAEDVGSNK (13-28) (SEQ ID NO: 4).

O termo "actividade", em referência a uma molécula do presente invento, inclui, mas não está limitado a, afinidade e especificidade epitopo/antigénio, capacidade para neutralizar ou antagonizar uma actividade do péptido A $\beta$  *in vivo* ou *in vitro*, IC<sub>50</sub>, estabilidade *in vivo* do anticorpo e propriedades imunogénicas do anticorpo. Outras propriedades ou características biológicas identificáveis de um anticorpo reconhecidas na técnica incluem, por exemplo, reactividade cruzada, (*i.e.*, com homólogos não humanos do péptido alvo ou com outras proteínas ou tecidos, em geral) e capacidade para preservar elevados níveis de expressão da proteína em células de mamífero. As propriedades ou características acima mencionadas podem ser observadas, medidas ou avaliadas utilizando técnicas reconhecidas na especialidade, incluindo, mas não limitadas a, ELISA, ELISA competitivo, Biacore ou análise de ressonância de plasmão de superfície KinExA, ensaios de neutralização *in vitro* ou *in vivo* sem limite, ligação do receptor, produção e/ou secreção de citocinas ou factores de crescimento, transdução de sinal e imuno-histoquímica com secções de tecido de diferentes fontes, incluindo humano, primata, ou qualquer outra fonte.

Os termos "indivíduo", "sujeito" e "paciente", aqui utilizados alternadamente, referem-se a um mamífero, de preferência humano. Numa determinada concretização, o sujeito é ainda caracterizado por uma doença ou distúrbio ou condição que possa beneficiar de uma actividade diminuída de péptido A $\beta$ .

Tal como aqui utilizado, as expressões "célula hospedeira", "linha celular hospedeira", e "cultura de células hospedeiras" são utilizadas indiferentemente e incluem uma célula individual ou cultura de células que é um receptor de qualquer polinucleótido isolado do invento ou qualquer ou quaisquer vectores recombinantes compreendendo uma sequência codificando uma HCVR, LCVR ou anticorpo monoclonal do invento. As células hospedeiras incluem a descendência de uma única célula hospedeira. A descendência pode não ser completamente idêntica, em morfologia ou no complemento total do ADN, à célula-mãe original devido a mutação e/ou alteração natural, acidental ou deliberada. Uma célula hospedeira inclui células transformadas, transduzidas ou infectadas com um vector recombinante ou um polinucleótido expressando um fragmento de anticorpo do invento ou uma cadeia leve ou cadeia pesada deste. Uma célula hospedeira que comprehende um vector recombinante do invento, quer estavelmente incorporado no cromossoma hospedeiro quer não, pode também ser referida como uma "célula hospedeira recombinante". Células preferidas para a geração de células hospedeiras do invento são

células CHO (*e.g.*, ATCC CRL-9096), células NS0, células SP2/0, células COS (ATCC *e.g.*, CRL-1650, CRL-1651) e HeLa (ATCC CCL-2). Células hospedeiras adicionais para utilização do invento incluem células vegetais, células de levedura, outras células de mamífero e células procarióticas. De maior preferência, as células para utilização do invento são células de levedura ou procarióticas.

O termo "condição ou doença relacionada com o péptido A $\beta$ " ou "condições ou doença associadas a actividade de A $\beta$ " pretende incluir todos as condições, distúrbios e doenças que estão associados a: 1) o desenvolvimento de placas de  $\beta$ -amilóide no cérebro, 2) a síntese de formas anormais de A $\beta$ , 3) a formação de formas particularmente tóxicas de A $\beta$ , ou 4) taxas anormais de síntese, degradação, ou eliminação de A $\beta$ . As condições e doenças tais como doença de Alzheimer, síndroma de Down, angiopatia amilóide cerebral, certas demências vasculares, e comprometimento cognitivo leve são conhecidas por ou suspeitas de ter uma tal relação com A $\beta$ .

Esta divulgação proporciona uma molécula compreendendo um fragmento de anticorpo que se liga especificamente ao péptido A $\beta$  entre as posições de aminoácidos 13-28, em que o fragmento de anticorpo está covalentemente ligado a uma molécula de PEG. O fragmento de anticorpo é de preferência um fragmento de anticorpo humanizado, tal como fragmento Fab e/ou fragmento scFv. De maior preferência, o fragmento de anticorpo é um fragmento Fab. A ligação

específica das moléculas do invento ao péptido A $\beta$  permite que as referidas moléculas sejam utilizadas como agente terapêutico para doenças e distúrbios associados ao péptido A $\beta$ , i.e., condições, doenças ou distúrbios que beneficiem da inibição de uma actividade biológica do péptido A $\beta$ .

Numa concretização, o fragmento de anticorpo possui uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que a região variável de cadeia leve compreende regiões CDR com as seguintes sequências de aminoácidos: CDRL1: **SSSQSLIYSDGNAYLH** (SEQ ID NO: 6), CDRL2: **KVSNRFS** (SEQ ID NO: 7) e CDRL3: **TQSTHSPWT** (SEQ ID NO: 8) e/ou em que a região variável de cadeia pesada compreende regiões CDR com as seguintes sequências de aminoácidos: CDRH1: **GYTFSRYSMS** (SEQ ID NO: 9), CDRH2: **QINIRGCNTYYPDTVKG** (SEQ ID NO: 10) ou **QINIRGNNTYYPDTVKG** (SEQ ID NO: 11), e CDRH3: **GDF** (SEQ ID NO: 12). De preferência, as seis CDR de um fragmento de anticorpo existem em conjunto. A composição compreendendo uma CDR será em geral uma sequência de cadeia pesada ou leve de anticorpo ou uma porção substancial desta, em que a CDR se localiza num local consistente com a numeração de Kabat. As três regiões CDR para cada cadeia, pesada e leve, são proporcionadas numa região estrutural como uma sequência contígua representada pela seguinte fórmula: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. As FR1, FR2, FR3 e FR4 de cadeia pesada ou de cadeia leve combinam-se para formar a região estrutural completa de um fragmento de anticorpo quando dispostas como uma sequência contígua com as CDR na ordem indicada. De preferência, as regiões

estruturais de um anticorpo são de origem humana, ou substancialmente de origem humana (i. e., mais de cerca de 80, 82, 85, 87, 90, 92, 95, 97%).

De preferência, o fragmento de anticorpo do invento compreende uma LCVR compreendendo um péptido com a seguinte sequência:

**DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCSSSOSLIYSDGNAYLHWYLQKP  
GQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG  
VYYCTOSTHSPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 1)**

e uma HCVR compreendendo um péptido com uma sequência seleccionada a partir do grupo que consiste nas seguintes sequências:

**EVQLVESGGGLVKPGGSLRISCAASGYTFSRYSMSWVRQAPG  
KGLEWVGQINIRGCNTYYPDTVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNS  
LKTEDTAVYYCTTGDFWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 2)**

**EVQLVESGGGLVKPGGSLRISCAASGYTFSRYSMSWVRQAPG  
KGLEWVGQINIRGNNTYYPDTVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNS  
LKTEDTAVYYCTTGDFWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 3)**

Alternativamente, o fragmento de anticorpo comprehende uma LCVR compreendendo um péptido com uma sequência consistindo em SEQ ID NO: 1 e uma HCVR compreendendo um péptido com uma sequência seleccionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 3, em que a HCVR e a LCVR existem em conjunto num fragmento de anticorpo. O

especialista na técnica compreenderá que os fragmentos de anticorpo não estão limitados às sequências específicas de HCVR e LCVR, mas incluem também variantes destas sequências que, quando presentes numa molécula do invento, mantêm ou melhoram a capacidade de ligação ao antigénio e pelo menos uma outra propriedade funcional do anticorpo-mãe, *e.g.*, especificidade do epitopo, capacidade de competir com o anticorpo-mãe pela ligação ao péptido A $\beta$ , valores de IC<sub>50</sub> e/ou K<sub>D</sub> ou k<sub>off</sub> para a ligação ao péptido A $\beta$ .

Noutra concretização, a totalidade ou uma porção da região variável é limitada por uma sequência LCVR particular tal como mostrado por uma SEQ ID NO: 1 e HCVR tal como mostrada em SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 3 e é ainda caracterizado por antagonizar ou neutralizar pelo menos uma actividade do péptido A $\beta$  *in vivo* ou *in vitro*. Um anticorpo, em que a totalidade ou uma porção da região variável é limitada por uma sequência particular, tal como mostrado por uma LCVR SEQ ID NO: 1 e HCVR SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 3 aqui, é ainda caracterizado por se ligar especificamente ao péptido A $\beta$  humano mas não se ligar à APP humana.

Num aspecto, o PEG (ou um derivado deste) está covalentemente ligado a um ou mais resíduos de lisina, cisteína ou de aminoácidos não naturais modificados de um fragmento de anticorpo. De preferência, a molécula de PEG está covalentemente ligada quer à região variável de cadeia pesada quer à região variável de cadeia leve do fragmento de anticorpo. De maior preferência, uma tal molécula possui

uma molécula de PEG que está covalentemente ligada a uma CDR de uma região variável de cadeia pesada do fragmento de anticorpo. De maior preferência, uma tal molécula possui uma molécula de PEG que está covalentemente ligada à cisteína na posição de aminoácido 56 da região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 2. Alternativamente, as moléculas de PEG podem ser ligadas ao fragmento de anticorpo Fab anti-péptido A $\beta$  através de uma molécula ligadora ou espaçadora à região charneira do fragmento de anticorpo.

Noutro aspecto, a molécula de PEG está covalentemente ligada a um ou mais resíduos de lisina, cisteína ou de aminoácidos não naturais modificados do anticorpo do presente invento para substituir uma glicosilação presente nas moléculas de anticorpo, sem afectar significativamente a afinidade e selectividade do fragmento de anticorpo para A $\beta$ . De preferência, a molécula de PEG substitui o sinal de glicosilação na região variável da cadeia pesada ou na região variável de cadeia leve do fragmento de anticorpo. De maior preferência, a molécula de PEG substitui o sinal de glicosilação na CDR da região variável de cadeia pesada do fragmento de anticorpo. De maior preferência, a molécula de PEG substitui o sinal de glicosilação na posição 56 da região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 2.

A molécula de PEG covalentemente ligada a um anticorpo não se destina a ser limitada a um determinado tipo ou tamanho. O peso molecular do PEG é de preferência de cerca de 0,5 kD a cerca de 100 kD, e de maior

preferência de cerca de 0,5 kDa a cerca de 30 kDa, e ainda de preferência de cerca de 1 kDa a cerca de 20 kDa. Alternativamente, o peso molecular do PEG pode ser seleccionado a partir de um grupo que consiste em cerca de 0,5 kD, cerca de 1 kD, cerca de 5 kD, cerca de 10 kD e cerca de 20 kD. O PEG pode ser linear ou ramificado e o anticorpo anti-péptido A $\beta$  PEGuilado pode ter mais de uma molécula de PEG ligada ao péptido. De preferência, existe uma molécula de PEG por anticorpo anti-péptido A $\beta$  PEGuilado.

De maior preferência, a molécula de anticorpo comprehende um fragmento de anticorpo com uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 1 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 2, em que o referido fragmento de anticorpo está covalentemente ligado a uma molécula de PEG de 20 kD na posição 56 da região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 2.

O epitopo antigénico do péptido A $\beta$  dentro do qual os anticorpos do invento se ligam, é um epitopo linear, não linear ou conformacional que comprehende os aminoácidos HHQKLVFFAEDVGGSNK (SEQ ID NO: 4). Os anticorpos que se ligam ao referido epitopo, ligam-se especificamente e de preferência ao péptido A $\beta$  em comparação com a sua ligação a APP. Os anticorpos monoclonais do invento ligam-se ao péptido A $\beta$  pelo menos 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, ou 100 vezes mais (e.g., maior afinidade ou maior especificidade) do que se ligam à APP humana; de maior

preferência pelo menos 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 ou 600 vezes mais do que se ligam a APP, ainda de preferência não se ligam a APP a níveis superiores aos do fundo tal como determinado, *e.g.*, através de ensaio ELISA, ensaio ELISA de competição ou valores de  $K_D$  num ensaio Biacore ou KinExA.

Os fragmentos de anticorpos ligam-se a um epitopo entre os aminoácidos HQKLVFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 5) pelo menos 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, ou 100 vezes mais (*e.g.*, maior afinidade ou maior especificidade) que um epitopo não compreendendo os aminoácidos HQKLVFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 5). De maior preferência, pelo menos 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 ou 600 vezes mais que com um epitopo não compreendendo os aminoácidos HQKLVFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 5), ainda de preferência não se liga a um epitopo não compreendendo os aminoácidos HQKLVFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 5) a níveis superiores aos do fundo tal como determinados, *e.g.*, através de ensaio ELISA, ensaio ELISA de competição ou valores de  $K_D$  num ensaio Biacore ou KinExA.

Numa concretização preferida, a divulgação proporciona um fragmento de anticorpo que possui uma forte afinidade de ligação para o péptido A $\beta$ , *i.e.*, liga-se ao péptido A $\beta$ , ou a uma porção deste compreendendo a sequência HQKLVFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 5) [*i.e.*, o anticorpo contacta o polipéptido HQKLVFFAEDVGSNK], com uma afinidade de ligação ( $K_D$ ) para o péptido A $\beta$  humano de menos de cerca de

200 pM, 100 pM, 50 pM, 40 pM ou 30 pM, de preferência menos de cerca de 20 pM medida através do método KinExA. Alternativamente, a afinidade de ligação ( $K_D$ ) para o péptido A $\beta$  humano é de entre 0,1 pM-200 pM. As afinidades dos anticorpos podem ser determinadas tal como é aqui descrito nos exemplos abaixo ou outros métodos disponíveis na técnica.

A via de administração de um anticorpo do presente invento pode ser oral, parentérica, através de inalação, ou tópica. De preferência, os anticorpos do invento podem ser incorporados numa composição farmacêutica adequada para administração parentérica. O termo parentérico tal como aqui utilizado inclui a administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, rectal, vaginal, ou intraperitoneal. A distribuição sistémica periférica através de injecção intravenosa ou intraperitoneal ou subcutânea é preferida. De maior preferência, a via de administração de um anticorpo do presente invento é através de injecção subcutânea. Veículos adequados para tais injecções são simples na técnica.

O fragmento de anticorpo do presente invento tem uma semivida mais curta do que o correspondente anticorpo anti-péptido A $\beta$  inteiro no plasma e é eliminado mais rapidamente do plasma que o correspondente anticorpo anti-péptido A $\beta$  inteiro. Alternativamente, o anticorpo do presente invento tem uma semivida plasmática mais longa que o correspondente fragmento Fab anti-péptido A $\beta$  que não está

covalentemente ligado a uma molécula de PEG, e é eliminado menos rapidamente do plasma que o correspondente fragmento Fab anti-péptido A $\beta$  que não está ligado covalentemente a uma molécula de PEG (Exemplos 1, 2 e 3). O termo "correspondente" em referência a um anticorpo tal como aqui utilizado refere-se a um anticorpo com a mesma LCVR e HCVR. Por exemplo, o correspondente anticorpo inteiro em referência a um fragmento de anticorpo Fab possuindo uma LCVR de SEQ ID NO: 1 e uma HCVR consistindo em SEQ ID NO: 2 terá a mesma LCVR de SEQ ID NO: 1 e uma HCVR consistindo em SEQ ID NO: 2 juntamente com um domínio Fc intacto.

Noutro aspecto, a presente divulgação é dirigida a polinucleótidos recombinantes codificando anticorpos que, quando expressos, compreendem uma LCVR de SEQ ID NO: 1 e uma HCVR consistindo em SEQ ID NO: 2. Devido à degenerescência dos codões, outras sequências polinucleotídicas podem facilmente substituir essas sequências. Polinucleótidos particularmente preferidos codificam anticorpos, que, quando expressos, compreendem as CDR de cadeia leve de SEQ ID NO: 6-8, e as CDR de cadeia pesada de SEQ ID NO: 9, 10 ou 11, e 12, ou qualquer uma das regiões variáveis de SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 3. Exemplos de sequências polinucleotídicas que codificam para LCVR de SEQ ID NO: 1 e HCVR de SEQ ID NO: 2 estão representadas em SEQ ID NO: 13 (LCVR) e SEQ ID NO: 14 (HCVR), respectivamente.

Os polinucleótidos incluirão ainda tipicamente uma sequência polinucleotídica de controlo da expressão

operativamente ligada às sequências de codificação da imunoglobulina humanizada, incluindo regiões promotoras naturalmente associadas ou heterólogas. De preferência, as sequências de controlo da expressão serão sistemas promotores eucarióticos em vectores capazes de transformar ou transfectar células eucarióticas, mas sequências de controlo para células procarióticas podem também ser utilizadas. Uma vez que o vector tenha sido incorporado na linha de células hospedeiras adequada, a célula hospedeira é propagada sob condições adequadas para expressão das sequências nucleotídicas, e, tal como desejado, a colheita e purificação das cadeias leves, cadeias pesadas, dímeros de cadeia leve/pesada ou anticorpos intactos, fragmentos de ligação ou outras formas das imunoglobulinas pode seguir-se.

As sequências de ácidos nucleicos capazes de finalmente expressar os anticorpos ou fragmentos de anticorpo desejados podem ser formadas a partir de uma variedade de diferentes polinucleótidos (ADN genómico ou ADNc, ARN, oligonucleótidos sintéticos, etc.) e componentes (e.g., regiões V, J, D, e C), utilizando qualquer uma de uma variedade de técnicas bem conhecidas. A união de sequências genómicas e sintéticas apropriadas é um método de produção comum, mas podem também ser utilizadas sequências de ADNc.

Sequências de ADN da região constante humana podem ser isoladas de acordo com procedimentos bem

conhecidos a partir de uma variedade de células humanas, mas de preferência a partir de células B imortalizadas. As células fonte adequadas para as sequências polinucleotídicas e as células hospedeiras para expressão e secreção de imunoglobulinas podem ser obtidas a partir de várias fontes bem conhecidas na técnica.

Para além dos anticorpos humanizados ou fragmentos de anticorpo aqui especificamente descritos, outros anticorpos modificados "substancialmente homólogos" podem ser facilmente concebidos e produzidos utilizando várias técnicas de ADN recombinante bem conhecidas dos peritos na especialidade. Por exemplo, as regiões estruturais podem variar das sequências nativas ao nível da estrutura primária por diversas substituições de aminoácidos, adições e deleções terminais e intermédias, e semelhantes. Além disso, uma variedade de diferentes regiões estruturais humanas podem ser utilizadas isoladamente ou em combinação como base para os anticorpos humanizados do presente invento. Em geral, modificações dos genes podem ser facilmente alcançadas através de uma variedade de técnicas bem conhecidas, tais como mutagénese dirigida ao local.

Tal como foi referido anteriormente, os polinucleotídos serão expressos em hospedeiros após as sequências terem sido operativamente ligadas a (*i.e.*, posicionadas para assegurar o funcionamento de) uma sequência de controlo da expressão. Estes vectores de expressão são tipicamente replicáveis nas células hospedeiras quer como

epissomas quer como parte integrante do ADN cromossómico hospedeiro. Vulgarmente, os vectores de expressão conterão marcadores de selecção, e.g., tetraciclina ou neomicina, para permitir a detecção das células hospedeiras transformadas com as sequências de ADN desejadas. Os vectores de expressão para estas células podem incluir sequências de controlo da expressão, tais como uma origem de replicação, um promotor, um estimulador, e locais necessários para processamento de informação, tais como locais de ligação ao ribossoma, locais de *splicing* de ARN, locais de poliadenilação, e sequências de terminação da transcrição. Sequências de controlo da expressão preferidas são promotores derivados de genes de imunoglobulinas, SV40, Adenovírus, Vírus do Papiloma Bovino, citomegalovírus e semelhantes.

Os vectores contendo as sequências polinucleotídicas de interesse (e.g., as sequências de codificação da cadeia pesada e leve e as sequências de controlo da expressão) podem ser transferidos para a célula hospedeira através de métodos bem conhecidos, que variam dependendo do tipo de célula. Uma variedade de hospedeiros pode ser empregue para expressar os anticorpos utilizando técnicas bem conhecidas na especialidade. Linhas celulares preferidas incluem células COS, CHO, SP2/0, NS0 (disponíveis a partir de repositórios públicos tais como ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA) e linhas de células de levedura. De preferência, uma célula hospedeira compreende um ou mais vectores ou construções

compreendendo uma molécula de ácido nucleico. A célula hospedeira é uma célula na qual um vector foi introduzido, o referido vector compreendendo um polinucleótido codificando para uma LCVR e/ou um polinucleótido codificando para uma HCVR. A divulgação proporciona também uma célula hospedeira na qual foram introduzidos dois vectores; um compreendendo um polinucleótido codificando uma LCVR de um anticorpo e um compreendendo um polinucleótido codificando uma HCVR presente num anticorpo e cada um operativamente ligado a uma sequência promotora. Os tipos celulares incluem células de mamífero, bacterianas, vegetais e de levedura. De preferência, a célula é uma célula CHO, uma célula COS, uma célula SP2/0, uma célula NS0, uma célula de levedura ou um derivado ou descendência de qualquer tipo de célula preferido.

Uma vez expressos, os anticorpos inteiros, os seus dímeros, cadeias leves e pesadas individuais, ou outras formas de imunoglobulina podem ser purificados de acordo com procedimentos padrão da técnica, incluindo precipitação com sulfato de amónio, cromatografia de permuta iônica, afinidade, fase inversa, em coluna de interacção hidrofóbica, electroforese em gel e semelhantes. Para utilizações farmacêuticas, são preferidas imunoglobulinas substancialmente puras de pelo menos cerca de 90%, 92%, 94% ou 96% de homogeneidade, e mais preferidas de 98 a 99% ou mais de homogeneidade. Uma vez purificados, parcialmente ou até à homogeneidade conforme desejado, os péptidos podem então ser usados terapeuticamente ou profilacticamente, tal como aqui dirigido.

Vários sintomas que resultam em défices cognitivos, acidente vascular cerebral, hemorragia cerebral, e debilitação mental geral parecem estar associados a placas neuríticas e cerebrovasculares no cérebro contendo o péptido de A $\beta$ . Entre estas condições estão a doença de Alzheimer tanto pré-clínica como clínica, a síndrome de Down, e a angiopatia amilóide cerebral (CAA) pré-clínica e clínica. As placas amilóides são formadas a partir do péptido A $\beta$ . Estes péptidos circulam no sangue e no fluido cerebrospinal (CSF) tipicamente na forma complexada com lipoproteínas. O péptido A $\beta$  na forma circulante é composto por 39-43 aminoácidos (principalmente 40 ou 42 aminoácidos) resultantes da clivagem de uma proteína precursora comum, a proteína precursora de amilóide, frequentemente designada APP. Algumas formas de A $\beta$  solúvel são neurotóxicas em si mesmas e pode-se determinar a gravidade da neurodegeneração e/ou declínio cognitivo (McLean, C.A., et al., *Ann. Neurol.* (1999) 46: 860-866; Lambert, M.P., et al. (1998) 95: 6448-6453; Naslund, J., *J. Am. Med. Assoc.* (2000) 283: 1571).

Por conseguinte, uma composição farmacêutica compreendendo uma molécula do invento pode ser útil para o tratamento ou a prevenção de condições em que a presença do péptido A $\beta$  causa ou contribui para efeitos patológicos indesejáveis ou a diminuição da actividade do péptido A $\beta$  tem um benefício terapêutico em mamíferos, de preferência humanos, incluindo, mas não limitado a, doença de Alzheimer

clínica ou pré-clínica, síndroma de Down, angiopatia amilóide (CAA) clínica ou pré-clínica e Alzheimer prodromico. A utilização de uma molécula do presente invento para tratamento ou prevenção de pelo menos um dos distúrbios acima mencionados em que a actividade do péptido A $\beta$  é prejudicial ou beneficia de níveis menores de péptido A $\beta$  bioactivo está aqui contemplada. Além disso, a utilização de uma molécula do presente invento para utilização no fabrico de um medicamento para o tratamento de pelo menos um dos distúrbios acima mencionados está contemplada.

Tal como aqui utilizado, os termos "tratamento", "tratar", e semelhantes, referem-se à obtenção de um efeito farmacológico e/ou fisiológico desejado. O efeito pode ser uma cura parcial ou completa para uma doença e/ou efeito adverso atribuível à progressão da doença. "Tratamento", tal como aqui utilizado, inclui a administração de um composto, particularmente a um humano, e inclui: (a) inibição da doença, *i.e.*, paragem do seu desenvolvimento; ou (b) alívio da doença, *i.e.*, causando a regressão da doença ou distúrbio ou alívio dos sintomas ou complicações destes. Os regimes de dosagem podem ser ajustados para proporcionar a resposta desejada óptima (*e.g.*, uma resposta terapêutica ou profiláctica). Por exemplo, pode ser administrado um único bolo, podem ser administradas várias doses divididas ao longo do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada tal como indicado pelas exigências da situação terapêutica.

Uma molécula do invento pode ser incorporada em composições farmacêuticas adequadas para administração a um sujeito. As moléculas do invento podem ser administradas sozinhas ou em combinação com um suporte, diluente e/ou excipiente farmaceuticamente aceitável, em dose únicas ou múltiplas. As composições farmacêuticas para administração são concebidas para serem apropriadas para o modo de administração seleccionado, e o diluente, suporte, e/ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis tais como agentes de dispersão, tampões, tensioactivos, conservantes, agentes de solubilização, agentes de isotonicidade, agentes estabilizadores e semelhantes são usados conforme apropriado (ver, e.g., Exemplo 14 aqui). As referidas composições são concebidas de acordo com técnicas convencionais tais como em e.g., Remington, "The Science and Practice of Pharmacy", 19<sup>a</sup> Edição, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995 que proporciona um compêndio de técnicas de formulação que são geralmente conhecidas dos praticantes.

Uma composição farmacêutica compreendendo uma molécula do presente invento pode ser administrada a um sujeito em risco de ou exibindo patologias tal como aqui descrito utilizando técnicas de administração convencionais incluindo administração oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual, ou em supositório. De preferência, uma molécula do presente invento pode ser administrada a um sujeito em risco de ou exibindo patologias tal como aqui descrito, através de administração subcutânea.

Uma composição farmacêutica do invento é de preferência uma "quantidade terapeuticamente eficaz" ou uma "quantidade profilacticamente eficaz" de uma molécula do invento. A "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, nas dosagens e nos períodos de tempo necessários, para alcançar o resultado terapêutico desejado. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma molécula pode variar de acordo com factores tais como o estado de doença, a idade, o sexo, e o peso do indivíduo, e a capacidade da molécula para desencadear uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz é também uma em que qualquer efeito tóxico ou prejudicial da molécula, é compensado pelos efeitos terapeuticamente benéficos. Uma "quantidade profilacticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, nas dosagens e nos períodos de tempo necessários, para atingir o resultado profiláctico desejado. Tipicamente, uma vez que uma dose profiláctica é utilizada em sujeitos antes ou numa fase precoce da doença, a quantidade profilacticamente eficaz será inferior à quantidade terapeuticamente eficaz.

Uma quantidade terapeuticamente eficaz ou profilacticamente eficaz é pelo menos a dose mínima, mas inferior a uma dose tóxica, de um agente activo que é necessária para conferir o benefício terapêutico a um sujeito. Dito de outra forma, uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma molécula do invento é uma quantidade que, em mamíferos, de preferência humanos,

diminui a actividade do péptido A $\beta$ , e.g., a ligação ao péptido A $\beta$ , em que a presença do péptido A $\beta$  causa ou contribui para efeitos patológicos indesejáveis ou a diminuição do péptido A $\beta$  resulta num efeito terapêutico benéfico num mamífero, de preferência um humano.

A via de administração de uma molécula do presente invento pode ser oral, parentérica, por inalação ou tópica. De preferência, os anticorpos do invento podem ser incorporados numa composição farmacêutica adequada para administração parentérica. O termo parentérico, tal como aqui utilizado, inclui administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, rectal, vaginal ou intraperitoneal. A distribuição sistémica periférica através de injecção intravenosa ou intraperitoneal ou subcutânea é preferida. A injecção subcutânea é a mais preferida. Veículos adequados para tais injecções são simples na técnica.

A composição farmacêutica tem de ser tipicamente estéril e estável sob as condições de fabrico e armazenamento no recipiente proporcionado, incluindo e.g., um frasco ou uma seringa selados. Portanto, as composições farmacêuticas podem ser esterilizadas por filtração após a produção da formulação, ou tornadas de outra forma microbiologicamente aceitáveis. Uma composição típica para infusão intravenosa pode ter um volume de tanto quanto 250-1000 ml de fluido, tal como solução de Ringer, solução salina fisiológica, solução de dextrose e solução de Hank, e uma dose terapeuticamente eficaz (e.g., 1 a 100 mg/ml, ou

mais) do agente terapêutico para distribuir as dosagens típicas listadas abaixo. A dose pode variar dependendo do tipo e da gravidade da doença. Tal como é bem conhecido nas técnicas médicas, as dosagens para qualquer sujeito dependem de muitos factores, incluindo o tamanho do paciente, a área de superfície corporal, a idade, o composto particular a administrar, o sexo, o tempo e a via de administração, a saúde geral, e outros fármacos a administrar concomitantemente. Uma dose típica pode estar, por exemplo, no intervalo de 0,001 a 1000 µg; no entanto, são consideradas doses abaixo ou acima deste intervalo exemplar, especialmente considerando os factores acima mencionados. O regime de dosagem parentérica diária pode ser de cerca de 0,1 µg/kg a cerca de 100 mg/kg de peso corporal total, de preferência de cerca de 0,3 µg/kg a cerca de 10 mg/kg e de maior preferência de cerca de 1 µg/kg a 1 mg/kg, ainda de preferência de cerca de 0,5 a 10 mg/kg de peso corporal por dia. O progresso pode ser monitorizado através de avaliação periódica. Para administrações repetidas ao longo de vários dias ou mais, dependendo da condição, o tratamento é repetido até ocorrer a supressão desejada dos sintomas da doença. No entanto, outros regimes de dosagem podem ser úteis e não estão excluídos daqui. A dosagem desejada pode ser distribuída através de uma única administração de bolo, através de várias administrações de bolo, ou através de administração por infusão contínua da molécula, dependendo do padrão de decaimento farmacocinético que o praticante deseje atingir.

Estas quantidades sugeridas das moléculas do invento estão sujeitas a uma grande discrição terapêutica. O factor chave na selecção de uma dose e programa apropriados é o resultado obtido. Os factores para consideração neste contexto incluem o distúrbio particular a tratar, o mamífero particular a tratar, a condição clínica de cada paciente, a causa do distúrbio, o local de distribuição do anticorpo, o tipo particular de anticorpo, o método de administração, o programa de administração, e outros factores conhecidos dos médicos assistentes.

Os agentes terapêuticos do invento podem ser congelados ou liofilizados para armazenamento e reconstituídos num suporte estéril adequado antes da utilização. A liofilização e reconstituição podem conduzir a vários graus de perda de actividade do anticorpo. As dosagens podem ter de ser ajustadas para compensar.

Os exemplos seguintes destinam-se a ilustrar mas não a limitar o invento. Os exemplos aqui abaixo empregam, entre outros, um anticorpo monoclonal de murídeo denominado "266" (m266), que foi originalmente preparado por imunização com um péptido composto pelos resíduos 13-28 do péptido A $\beta$  humano e um fragmento Fab do anticorpo monoclonal de murídeo designado 266 (m266-Fab). O anticorpo é confirmado que imunorreage com este péptido. A preparação de m266 foi descrita anteriormente. Para ligar covalentemente uma molécula de PEG a m266-Fab, o Fab pode ser mutado para introduzir um resíduo de cisteína em CDR2 (N56C) da

cadeia pesada variável e PEGuilada do modo mostrado abaixo (Exemplo 4). Uma vez que os exemplos aqui descrevem experiências conduzidas em sistema de murídeo, a utilização de anticorpos monoclonais de murídeo é satisfatória. No entanto, nos métodos de tratamento do invento para uso humano, são preferidas formas humanizadas dos anticorpos do presente invento, ou fragmentos destas. O 1A1-Fab referido nos exemplos abaixo é um fragmento de anticorpo Fab humanizado que compreende LCVR de SEQ ID NO: 1 e HCVR de SEQ ID NO: 2.

**Exemplo 1****Estudos de FC/FD de m266-Fab PEG Subcutâneo em Ratinhos****PDAPP**

Ratinhos PDAPP transgénicos jovens (3 meses de idade) são utilizados para investigar a resposta farmacocinética/farmacodinâmica no plasma do anticorpo e complexo anticorpo-A $\beta$ . Vários anticorpos são investigados incluindo Fab 266 de rato (m266-Fab), m266-Fab + PEG 5 KD, m266-Fab + PEG 10 KD, m266-Fab + PEG 20 KD, e anticorpo IgG m266 inteiro intacto. Ratinhos PDAPP+/- são injectados subcutaneamente com 1 mg/kg de anticorpo e o plasma é subsequentemente isolado nos seguintes momentos: 1, 4, 8, 24, 48, 96, 168, e 240 horas após a dose. Os animais recebendo o anticorpo m266-Fab são analisados com momentos iniciais adicionais devido à rápida renovação desta porção. Os momentos para o m266-Fab são como se segue: 1, 4, 8, 12,

16, 24, e 48 horas após a dose. Um total de cinco animais é analisado por anticorpo por momento. Sangue completo é obtido através de punção cardíaca com agulhas de calibre 23 ligadas a seringas de 1 cm<sup>3</sup> previamente enxaguadas com EDTA 0,5 M. As amostras de sangue são incubadas em gelo durante o procedimento de isolamento e subsequentemente centrifugadas a 14.000 rpm numa microcentrífuga refrigerada a 4 graus durante 15 minutos. As amostras de plasma resultantes são divididas em alíquotas e armazenadas a -80 graus.

#### A. Metodologia para análises da FC de Fab

As concentrações plasmáticas de Fab são determinadas utilizando um ELISA de captura de antigénio. Resumidamente, as placas são revestidas com conjugado A $\beta$ -BSA de um dia para o outro a 4°C ou 1 hora a 37°C, em seguida bloqueadas com tampão de caseína Pierce. Os padrões, amostras de controlo e amostras de estudo são adicionados às placas, seguidos de uma hora de incubação à temperatura ambiente. Um anti-ratinho de cabra-HRP é utilizado para detecção e uma resposta colorimétrica é revelada com o substrato OPD. As placas são lidas a uma absorbância de A493 com uma referência de A700. As concentrações de imunorreactividade de amostras de plasma são determinadas a partir de curvas padrão preparadas a partir de quantidades conhecidas de Fab m266 no plasma de ratinho utilizando um algoritmo de parâmetro 4/5. O intervalo do ensaio para o Fab m266 é de 0,05 a 0,5 µg/ml. O intervalo para os Fab PEGuilados é de 0,075 a 0,8 µg/ml.

As concentrações de imunorreactividade das amostras de plasma são determinadas a partir de curvas padrão preparadas a partir de quantidades conhecidas de Fab m266 no plasma de ratinho utilizando um algoritmo de parâmetro 4/5. O intervalo de ensaio para o Fab 266 é de 0,05 a 0,5 µg/ml. O intervalo para os Fab PEGuilados é de 0,075 a 0,8 µg/ml. Os resultados demonstram claramente que a adição de uma molécula de PEG e o aumento do tamanho da molécula de PEG aumentam a retenção dos Fab peguilados no plasma (2545 ng/ml após 8 horas para o m266-Fab peguulado de 20K) em comparação com os m266-Fab não peguilados (350 ng/ml após 8 horas).

#### B. Ensaio ELISA de A $\beta$ do m266

Para medir a quantidade de A $\beta$  no plasma quer na ausência quer na presença de anticorpo terapêutico (inteiro ou fragmento Fab), é desenvolvido e utilizado um ensaio ELISA. Os péptidos A $\beta$  a medir nestes ensaios são A $\beta$ 1-40 ou A $\beta$ 1-42 inteiros. Placas de ELISA de 96 poços Immulon 4HBX de 96 poços (ThermoLabsystems) são revestidas de um dia para o outro a 4 graus com o anticorpo de captura C-terminal (m2G3 para placas A $\beta$ 40 ou m21F12 para placas de A $\beta$ 42) com 10 µg/ml em PBS (100 µl por poço). As placas de teste são seladas para evitar a evaporação durante a incubação de um dia para o outro. No dia seguinte, a solução dos poços é removida e os poços são lavados três vezes com PBS (400 µl por poço) com uma máquina de lavar de placas de 96 poços Labsystems. O tampão de bloqueio (360 µl

de leite a 1%-PBS) é adicionado e as placas incubadas a 37 graus durante uma hora. As amostras são preparadas através da diluição do plasma nos diluentes da amostra para produzir o seguinte: plasma a 20%, guanidina 0,5 M, Tris 5 mM, pH 8,0, mistura de inibidores de proteases 0,5×, m266 a 25 µg/ml, e PBS. Pode ser necessário que o volume de plasma utilizado no ensaio seja diminuído em certos momentos devido aos elevados níveis de péptido A $\beta$  presentes, e nestes casos, o volume de plasma residual é ajustado com plasma de rato (o volume percentual final é mantido a 20%). Os padrões de A $\beta$  com concentrações variando de 250 pg/ml a 3,9 pg/ml são gerados em diluente padrão (plasma de rato a 20%, guanidina 0,5 M, Tris 5 mM pH 8,0, e mistura completa de inibidores de proteases 0,5× livre de EDTA (Roche Diagnostics), m266 a 25 µg/ml, e PBS). A incorporação de 25 µg/ml de m266 intacto tanto da amostra como em diluentes padrão é necessária para neutralizar qualquer interferência negativa que os níveis variáveis dos anticorpos do domínio central possam exercer no ensaio. Após bloqueio, as placas são lavadas 4 vezes com PBS. As amostras e os padrões são carregados em triplicado (100 µl por poço) e a placa é selada e incubada de um dia para o outro 4 graus. Na manhã seguinte, as placas são lavadas 4 vezes com PBS-T (PBS + Tween-20 a 0,05%) e os poços incubados com o anticorpo secundário biotinilado m3D6 (100 µl por poço diluído em BSA a 0,5%/PBS-T) durante 2 horas à temperatura ambiente. Após as placas serem lavadas 4 vezes com PBS-T, são incubadas com estreptavidina-poliHRP (1:5000 em BSA/PBS-T a 0,5%) durante 1,5 horas à temperatura ambiente. As placas são

lavadas 4 vezes com PBS-T e são adicionados 100 µl por poço de substrato TMB (Sigma). A progressão colorimétrica é monitorizada a 650 nm a 15, 30, e 60 minutos.

Tabela 1. Resultados Farmacodinâmicos: Concentração

Plasmática Média para A $\beta$  40 (pg/ml)

Tempo (h)	Fab m266	Fab m266 + PEG 5 kDa	Fab m266 + PEG 10 kDa	Fab m266 + PEG 20 kDa	m266 Intacto
1	246,7	253,5	178,4	196,3	223,7
4	498,8	693,2	898,1	816,6	1110
8	576,7	997,8	1011	1259	1852
12	530,9				
18	344,1				
24	181,2	914,7	1728	2966	6919
48		200,1	789,6	2642	8557
96		79,1	104,8	329,3	10792
168		62,64	76,49	143,3	9923
240		50,14	98,24	101,2	6114

Para além de um esquema de dosagem mais flexível, que pode ser manipulado com base no tamanho do PEG, os resultados demonstram que o complexo Fab PEGuilado-antigénio não se acumula em circulação no plasma por um longo período de tempo como o anticorpo intacto (m266 intacto). O anticorpo intacto prolonga a semivida do anticorpo no plasma e resulta no complexo antigénio-anticorpo estar presente em circulação no plasma por um longo período de tempo (> 240 horas). Os Fab nativos (Fab

m266), por outro lado, têm uma velocidade de eliminação rápida e uma semivida curta (<24 horas) que limitam a sua utilização como terapia. Em contraste, tal como demonstrado na Tabela 1, os Fab peguilados proporcionam uma molécula de anticorpo com uma farmacocinética e farmacodinâmica que permitem um melhor regime de dosagem.

**Exemplo 2****Estudos de FC/FD de 1A1-Fab PEG Subcutâneo em Ratinhos****PDAPP**

Os estudos são realizados em ratinhos transgénicos PDAPP jovens (3 meses de idade) para investigar a resposta farmacocinética/farmacodinâmica no plasma do anticorpo e complexo anticorpo- $\text{A}\beta$ . São investigados vários anticorpos incluindo Fab 1A1 humanizado, Fab 1A1 + PEG 5 KD, Fab 1A1 + PEG 10 KD, e Fab 1A1 + PEG 20 KD. Ratinhos PDAPP+/- são injectados subcutaneamente com 1 mg/kg de anticorpo e o plasma é subsequentemente isolado em diferentes momentos, dependendo do grupo de injecção de anticorpo. São usados os seguintes momentos para os vários anticorpos:

Fab 1A1 são sangrados a 1, 4, 8, 12, 18, 24, e 48 horas após a dose

Fab 1A1 + PEG 5 KD são sangrados a 1, 4, 8, 24, 48, 96, e 168 horas após a dose

Fab 1A1 + PEG 10 KD são sangrados a 1, 4, 8, 24, 48, 96, e 168 horas após a dose

Fab 1A1 + PEG 20 KD são sangrados a 1, 8, 24, 48, 96, 168, e 240 horas após a dose

É analisado um total de cinco animais por anticorpo por momento. As amostras de plasma resultantes são divididas em aliquotas e armazenadas a -80 graus.

#### A. Metodologia para análise da FC de Fab

As concentrações plasmáticas de Fab 1A1 para Fab 1A1 são determinadas utilizando um ELISA em sanduíche. As placas são revestidas com padrões de cabra anti-IgG capa humana, amostras de controlo e amostras de estudo são adicionadas às placas e depois incubadas durante uma hora à temperatura ambiente. É utilizado uma IgG de cabra anti-humano para detecção seguida por OPD para uma resposta colorimétrica. As placas são lidas a uma absorbância de A493 com uma referência de A700.

As concentrações para as amostras no plasma são determinadas a partir de curvas padrão preparadas com quantidades conhecidas de Fab 1A1 em plasma de ratinho utilizando um algoritmo de parâmetro 4/5; o intervalo para o ensaio de Fab e Fab-PEG 5 KD é de 0,003 a 0,3 µg/ml; os intervalos para os ensaios de Fab-PEG 10 KD são 0,006 a 0,2 e 0,04 a 0,4 µg/ml; os intervalos para os ensaios de Fab PEG 10 KD são 0,02-0,4 e 0,04-0,4 µg/ml. Os resultados demonstram claramente que a adição de uma molécula de PEG e o aumento do tamanho da molécula de PEG aumenta a retenção dos Fab peguilados no plasma (77 ng/ml após 96 horas para

Fab 1A1 Peguilado de 10 KD) em comparação com o Fab 1A1 não Peguilado (não detectável após 24 horas).

#### B. Ensaio ELISA de A $\beta$ de 1A1

O ELISA é essencialmente o mesmo que descrito acima para m266. As amostras são preparadas através de diluição de plasma nos diluentes de amostra para produzir o seguinte: plasma a 20%, guanidina 0,5 M, Tris 5 mM, pH 8,0, mistura de inibidores de proteases 0,5×, 1A1 a 20 µg/ml, e PBS. Os péptidos A $\beta$  a medir nestes ensaios são A $\beta$ 1-40 ou A $\beta$ 1-42 inteiros. A progressão colorimétrica é monitorizada a 650 nm, a 15, 30, e 60 minutos. Os resultados são apresentados na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2. Resultados da Farmacodinâmica: Concentração Média no Plasma para A $\beta$  40 (pg/ml)

Tempo (h)	Fab 1A1	Fab 1A1 + PEG 5 KD	Fab 1A1 + PEG 10 KD	Fab 1A1 + PEG 20 KD
1	136,8	117,1	116,3	111,2
4	153,6	208,2	281,6	
8	96,65	198,4	406,3	529,2
12	131,9			
18	105,9			
24	114,7	133,6	585,1	1243
48	106,8	95,12	170,7	642
96		88,48	113,7	177,9
168		93,96	110,8	125,4
240				200

De um modo semelhante aos Fab m266 no Exemplo 1, os dados da Tabela 2 demonstram que os Fab humanizados que estão covalentemente ligados a uma molécula de PEG proporcionam também um perfil de FC/FD ideal permitindo um programa de dosagem flexível e evitando ao mesmo tempo a acumulação do complexo anticorpo-antigénio em circulação no plasma por um longo período de tempo.

**Exemplo 3****Purificação de 266 de Murídeo e Análogos de Fab 1A1****Humanizado**

Os sobrenadantes da cultura de células transfectadas com Fab 266 de ratinho ou Fab 1A1 humanizado e análogos são purificados utilizando uma estratégia de cromatografia em dois passos consistindo em cromatografia de permuta cationica seguida por cromatografia de exclusão de tamanho usando resina Superdex 75 (GE Healthcare). Após colheita, o sobrenadante da cultura é concentrado utilizando TFF e dialisado contra um volume em excesso de 20 vezes de acetato de sódio 10 mM pH 5 de um dia para o outro a 4°C. O precipitado é removido através de centrifugação e o sobrenadante é carregado sobre um leito empacotado de SP-Sepharose (GE Healthcare) carregado com acetato de sódio 10 mM pH 5. A coluna é lavada com acetato de sódio 10 mM pH 5

contendo quantidades sucessivamente maiores de NaCl até o fragmento Fab ter eluído, aproximadamente a NaCl 90 a 110 mM. As fracções da coluna contendo Fab activo são identificadas e reunidas. O volume é reduzido e o tampão (PBS) mudado utilizando um dispositivo de concentração centrífuga (Millipore). O volume final é ajustado a 13 ml e carregado sobre uma coluna de dimensionamento Superdex 75. As fracções contendo Fab eluindo a aproximadamente 50 KD são identificadas e reunidas para posterior caracterização e PEGuilação.

**Exemplo 4****PEGuilação e Caracterização In vitro**

A Cisteína N56C no Fab 1A1 purificado a partir de cultura de células é bloqueada para PEGuilação. São utilizadas contas Reduce-Imm™ Immobilized Reductant de Pierce para reduzir selectivamente a Cisteína N56C. As contas Reductant são extraídas da coluna proporcionada pelo fabricante e utilizadas de um modo descontínuo. Primeiramente são activados ≈4 ml de contas com 8 ml de DTT 10 mM em Tampão de Equilíbrio Reduce-IMM #1 (fosfato de sódio + EDTA, pH 8,0) durante 30 min. As esferas são então lavadas três vezes com PBS. São adicionados 18 ml de Fab 1A1 N56C a 1,7 mg/ml em PBS pH 7,4 às contas e é adicionado EDTA 10 mM à mistura. A mistura é girada e incubada à temperatura

ambiente durante 4-5 horas. O Fab é separado das contas utilizando separadores de resina Handee™ e as contas são lavadas com PBS. O Fab e as lavagens são combinados, e feitos reagir com um excesso molar de 5 vezes de PEG-maleimida (20kPEG de NOF; 10kPEG de Sunbio; 5kPEG de Nektar) durante uma hora. A mistura reaccional é dializada contra 4 l de tampão de acetato de sódio 10 mM pH 5,0 para que o Fab e o Fab-PEG possam ser capturados numa coluna SP Sepharose que é equilibrada com tampão acetato de sódio 10 mM pH 5,0. O Fab e o Fab-PEG que não reagiram são eluídos com um gradiente salino. São eluídos entre NaCl 50 mM e 70 mM. A proteína é adicionalmente purificada através de cromatografia de exclusão de tamanho (coluna Superdex75, GE Healthcare) com PBS como fase móvel. A reacção de redução pode ser ampliada e reduzida. Métodos semelhantes podem ser utilizados para preparar Fab 266 N56C de murídeo PEGuilado.

As amostras são analisadas com cromatografia de exclusão de tamanho para confirmar a adição de PEG ao Fab. A cromatografia de exclusão de tamanho é realizada com coluna TSK G3000PW XL (Tosoh Bioscience). A coluna é corrida a 0,5 ml/min com PBS mais NaCl 0,35 M a pH 7,4 utilizando uma HPLC analítica Agilent série HP1100 operando a 214 nm. Além disso, as amostras são analisadas com SDS-PAGE. São carregados 10 µg de material purificado num gel Bis-Tris NuPage® a 4-12% e corado com SimplyBlue™ SafeStain.

**Exemplo 5*****Medição das Constantes Cinéticas com Biacore***

O instrumento BIACore® 2000 é também usado para medir a cinética de ligação. O Biacore® utiliza as propriedades ópticas da ressonância de plasmão de superfície para detectar alteração na concentração proteica de moléculas interactuantes dentro de uma matriz de biossensor de dextrano. Excepto tal como observado, todos os reagentes e materiais são adquiridos a Biacore® AB (Upsala, Suécia). Todas as medições são realizadas a 25°C. As amostras são dissolvidas em tampão HBS-EP (cloreto de sódio 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P-20 a 0,005% (p/v), e HEPES 10 mM, pH 7,4). O anticorpo de cabra anti-capta humana é imobilizado em células de fluxo de 1 a 4 de um *chip* sensor CM5 a um nível de 8000 unidades de resposta (Ru) usando um estojo de acoplamento de aminas.

A ligação é avaliada utilizando múltiplos ciclos de análise. Cada ciclo é realizado a um caudal de 50 µl/minuto e consiste nos seguintes passos: injeção de ≈20 µl de uma composição de ligação de anticorpos a 10 µg/ml com o objectivo de uma captura de 400-500 Ru, injeção de 250 µl de Abeta Humano (1-40) (a começar a 200 nM e utilizando diluições em série de duas vezes para cada

ciclo) seguido de 20 minutos para dissociação, e regeneração utilizando  $\approx$ 30  $\mu$ L de cloridrato de glicina 10 mM, pH 1,5. As taxas de associação e dissociação para cada ciclo são avaliadas usando um modelo "de ligação 1:1 (de Langmuir)" no suporte lógico BIAevaluation. Os resultados mostram que a PEGuição no local N56C tem pouco impacto na afinidade do Fab na ligação ao Abeta humano.

### **Exemplo 6**

#### **Medição das Constantes de Equilíbrio com KinExA**

É utilizada análise KinExA como uma abordagem ortogonal para medir a afinidade de ligação através da análise de ligação de equilíbrio devido à lenta taxa de saída do complexo antigénio-Fab. Um instrumento KinExA 3000 (Sapidyne Inst. Inc.) é usado para medir a cinética de ligação. Resumidamente, o antigénio é covalentemente acoplado a esferas de Sepharose e a ligação de Fab/Fab-PEG livre às contas é detectada no instrumento. Para medir a Kd, tubos individuais contendo Fab/Fab-PEG (20 pM ou 500 pM para o Fab 1A1-20kPEG, 5 pM ou 50 pM para o Fab 1A1) com o antigénio Abeta humano solúvel diluído em série de forma decrescente (1-40) (0-10 nM), são incubados durante 30-50 h a 37°C em PBS contendo BSA a 1 mg/ml para assegurar o alcance do equilíbrio. Após a incubação, Fab/Fab-PEG livre em cada amostra equilibrada é determinado no KinExA 3000 de

acordo com as instruções do fabricante. Os valores de  $K_d$  são determinados através da Análise da Curve n utilizando o suporte lógico KinExA 3000. Os resultados demonstram que o Fab 1A1 se liga fortemente a Abeta humano (19 pM), com uma afinidade 10 vezes superior em comparação com o Fab 266 de murídeo (240 pM). Além disso, a ligação covalente de PEG 20K no local N56C não tem impacto na afinidade do Fab 1A1 (12 pM).

**Exemplo 7****Análise de ligação da Proteína Precursora de Amilóide (APP)  
utilizando ELISA baseado em células**

Para avaliar a reactividade cruzada do Fab/mAb 266 com o precursor de Abeta APP, são utilizadas células HEK 293 expressando estavelmente APP (aa 1-751). Estas células são criadas através de clonagem do gene de APP (1-751) num plasmídeo contendo o marcador de resistência neomicina. O plasmídeo recombinante é transfetado para células HEK 293 e as células são seleccionadas em G418 a 200 µg/ml para gerar uma linha celular estável de sobre-expressão. Para ensaios de ligação, são plaqueadas 75.000 células APP 751 em cada poço de uma placa de 96 poços revestida com PDL. Após incubação durante 2 dias em meio de crescimento (DMEM F12, FBS a 5%, Hepes 10 mM pH 7,5, G418 a 200 µg/ml), o líquido é removido e 20 µg/ml de Fab ou mAb

são adicionados em PBS (com Ca/Mg) contendo BSA a 10 mg/ml. A ligação prossegue durante 2 horas a 4°C e as células são lavadas 3× com BSA a 10 mg/ml. Um anticorpo secundário (anti-cadeia leve capa conjugado com peroxidase de rábano (hrp)) específico para a cadeia leve humana ou de ratinho é adicionado em PBS/BSA (Southern Biotech). Uma diluição de 1:5000 em PBS/BSA é utilizada para anti-cadeia leve humana e 1:2000 para anti-cadeia leve de ratinho. Após uma hora de incubação a 4°C, as células são lavadas com BSA/PBS 5×. A actividade de hrp, em função da ligação de Fab/mAb a APP, é medida através da adição do substrato TMB durante 10 minutos. As reacções são transferidas para uma placa de 96 poços transparente e é medida a absorvância a 650 nm. Os dados indicam que o Fab 1A1 Peguilado (5 kD, 10 kD, e 20 kD) e o Fab m266 conferem selectividade para o péptido Abeta em relação a APP.

**LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS**

<110> Eli Lilly and Company  
Bales, Kelly R  
Bumol, Thomas F  
Chow, Chi-Kin  
Demattos, Ronald B  
Hansen, Ryan  
Kuchibholta, Uma  
Lu, Jirong  
McDonnell, Peter

<120> Fab de Beta-A PEGUILADO

<130> X17087

<150> US 60/885439

<151> 2007-01-18

<160> 14

<170> PatentIn versão 3.4

<210> 1

<211> 112

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2

<211> 112

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 2

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

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

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

Gly Gln Ile Asn Ile Arg Gly Cys Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
 50 55 60

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

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

Thr Thr Gly Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 100 105 110

<210> 3

<211> 112

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 3

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

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

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

Gly Gln Ile Asn Ile Arg Gly Asn Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65	70	75	80
----	----	----	----

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

Thr Thr Gly Asp Phe Trp Gly Gln Gly	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
100	105		110

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 4

His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys			
1	5	10	15

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 5

His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys			
1	5	10	15

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; construção sintética

&lt;400&gt; 6

Ser Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His			
1	5	10	15

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; construção sintética

&lt;400&gt; 7

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser			
1	5		

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; construção sintética

&lt;400&gt; 8

~~Thr Gln Ser Thr His Ser Pro Trp Thr~~  
1                   5

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; construção sintética

&lt;400&gt; 9

~~Gly Tyr Thr Phe Ser Arg Tyr Ser Met Ser~~  
1                   5                           10

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; construção sintética

&lt;400&gt; 10

~~Gln Ile Asn Ile Arg Gly Cys Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys~~  
1                   5                           10                           15

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; construção sintética

&lt;400&gt; 11

~~Gln Ile Asn Ile Arg Gly Asn Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys~~  
1                   5                           10                           15**Gly**

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 3

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; construção sintética

&lt;400&gt; 12

**Gly Asp Phe**  
1

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 657

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; construção sintética

&lt;400&gt; 13

gacatcgta	tgactcagac	tccattgtcc	ttgtctgtta	ctccaggta	accagcttct	60
atttctgtt	cetcetccca	atctttgatc	tsctccgacg	gtaacgctta	cttgactgg	120
tacttgcaaa	agcctggta	stccccacaa	ttgttgatct	acaaggtttc	caacsgattc	180
tatggtgtt	ctgacagatt	ttctggttcc	ggttccggta	ctgacttcac	tttgaagatc	240
tccagagttg	agctgagga	tgttggtgtt	tactactgta	ctcagtccac	tcattcccca	300
tggacttttg	gtgggtgtac	taagggttag	atcaagagaa	ctgttgcgtc	tccatccgtt	360
ttcattttcc	cccaatccga	cgaacaattt	aagtctggta	ctgtttccgt	tgtttgttttgc	420
ttqasacaact	tatccccaa	agaggtcaag	gttcagtgga	agtttgcacaa	cgtttgtca	480
tccgttact	cccaagaatac	cgttactgag	caagactcta	aggactccac	ttactcccttgc	540
ttctccactt	tgactttgtc	caaggctgtat	tacgagaagc	acaaggttta	cgcttgcgt	600
gttacacatc	agggtttgtc	ctccccagtt	actaagtccct	tcaacsgagg	agagtcc	657

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 657

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; construção sintética

&lt;400&gt; 14

gagggttcagt	tggttqaatc	tggtgggtgga	ttgggttaago	ctgggtggttc	tttggagatttgc	60
tccctgtgtt	cttccggta	cactttctcc	agatactcca	tgtctctgggt	tagacaagtttgc	120
ccaaaggaaagg	gattggagtg	gyttggtaaa	atcaacatca	gagggttgtaa	cacttactac	180
ccaaqacactg	ttaaggaaag	attcactatac	tccagagatg	actccaaagaa	cactttgtac	240
ttgcagatga	actcttttgc	sactgaggac	actgctgttt	actactgtac	tactggtgac	300
ttttggggac	aggaaactttt	ggttactgtt	taatccgttt	ctactasgg	accatccgtt	360
tttccatgg	ctccatccctc	taagttact	tccggtgta	ctgtgtttt	gggatgtttg	420

gttaaggact	acttccccaga	gccagttact	gtttccttgg	actccgggtgc	tttgaccttot	480
ggtgtttcaca	ctttcccagc	tgttttgc	tcttcgggtt	tgtactcatt	gtccctccgtt	540
gttactgttc	catacctttc	cttgggtact	cagacccaca	tctgttacgt	taaccacaa	600
ccatccaaca	ctaagggtga	ccagaaggtt	gaaccaaagt	cctctgacaa	gactcac	657

Lisboa, 14 de abril de 2015

**REIVINDICAÇÕES**

1. Molécula compreendendo um fragmento de anticorpo Fab que se liga especificamente ao péptido A $\beta$  humano entre as posições de aminoácidos 13 a 28, em que o fragmento de anticorpo compreende uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 1 e uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 2, e em que o referido fragmento de anticorpo Fab está covalentemente ligado a uma molécula de polietilenoglicol de 20 kD na cisteína no aminoácido 56 de SEQ ID NO: 2.

2. Molécula de acordo com a reivindicação 1, em que a molécula de polietilenoglicol é ligada através de uma ligação maleimida.

3. Molécula de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2 para utilização como medicamento.

4. Molécula de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2 para utilização no tratamento ou na prevenção de uma condição associada a actividade do péptido A $\beta$ , em que a condição é seleccionada a partir de doença de Alzheimer, síndroma de Down e angiopatia amilóide cerebral (CAA).

5. Molécula de acordo com a utilização da reivindicação 4, para utilização no tratamento ou na

prevenção de doença de Alzheimer, em que a referida doença de Alzheimer é doença de Alzheimer pré-clínica.

6. Molécula de acordo com a utilização da reivindicação 4, para utilização no tratamento ou na prevenção de doença de Alzheimer, em que a referida doença de Alzheimer é doença de Alzheimer clínica.

7. Composição compreendendo a molécula de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2.

8. Composição de acordo com a reivindicação 7 compreendendo ainda um suporte farmaceuticamente aceitável.

9. Composição de acordo com a reivindicação 7 ou a reivindicação 8 que é adequada para administração subcutânea.

Lisboa, 14 de abril de 2015

**REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO**

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

**Documentos de patentes citadas na Descrição**

- \* WO 2003062801 A
- \* WO 2004071408 A
- \* US 2008257398 A
- \* WO 2008040163 A
- \* US 5693761 A
- \* US 4816397 A
- \* US 5225539 A
- \* US 5445098 A
- \* US 5900461 A
- \* US 5933482 A
- \* US 6436386 A
- \* US 6448389 A
- \* US 6437825 A
- \* US 6405659 A
- \* US 6515100 A
- \* US 6514491 A
- \* US 60885439 B

**Literatura que não é de patentes citada na Descrição**

- \* TAMURA, Y. et al. *Neurobiol. of Dis.*, 2006, vol. 36, S41-S45
- \* CHAPMAN, ANDREW P. *PEGylated antibodies and antibody fragment for improved therapy: A review*, 17 June 2002, vol. 54 (54, 4), S31-S49
- \* WARD et al. *Nature*, 1989, vol. 341, 544-546 [0031]
- \* SIRD et al. *Science*, 1989, vol. 242, 423-426 [0031]
- \* HUSTON et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 5879-5883
- \* HOLLIGER, P. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 8444-8448
- \* POLJAK, R. et al. *Structure*, 1994, vol. 2, 1121-1133
- \* KIPRIYANOV, S. M. et al. *Human Antibodies and Myxomatosis*, 1995, vol. 2, 93-101
- \* KIPRIYANOV, S. M. et al. *Mol. Immunol.*, 1994, vol. 31, 1047-1058
- \* QUEEN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 2869
- \* LEVITT, M. *J. Mol. Biol.*, 1993, vol. 168, 695-620
- \* JONES et al. *Nature*, 1986, vol. 321, 523-525
- \* RIECHMANN et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327
- \* VERHOEYEN et al. *Science*, 1989, vol. 239, 1534-1538
- \* MCLEAN, C. A. et al. *Ann. Naturf.*, 1893, vol. 46, 860-868
- \* NASLUND, J. J. *Am. Med. Assoc.*, 2000, vol. 283, 1571
- \* Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*. Mack Publishing Co, 1995