



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0806715-5 A2**

(22) Data de Depósito: 09/01/2008
(43) Data da Publicação: 13/09/2011
(RPI 2123)



(51) Int.Cl.:
C07K 16/18
A61K 39/395
A61K 47/48
C12N 15/13
A61P 25/28

(54) Título: FAB PEGUILADO PARA ABETA

(30) Prioridade Unionista: 18/01/2007 US 60/885,439

(73) Titular(es): Eli Lilly And Company

(72) Inventor(es): Chi-Kin Chow, Jirong Lu, Kelly Renne Bales,
Peter Colon McDonnell, Ronald Bradley Demattos, Ryan John Hansen,
Thomas Frank Bumol, Uma Kuchibhotla

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2008050554 de
09/01/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/088983de
24/07/2008

(57) Resumo: FAB PEGUILADO PARA ABETA. A presente invenção refere-se a um método para tratar condições associadas à atividade do peptídeo A β profilática e terapeuticamente é descrito. O método emprega fragmentos de anticorpo humanizados que especificamente se ligam ao peptídeo A β humano entre as posições de aminoácido 13-28, em que os fragmentos de anticorpo são covalentemente ligados a uma molécula de polietileno glicol (PEG).



PI0806715-5

**Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "FAB PEGUI-
LADO PARA ABETA".**

A presente invenção refere-se a um fragmento de anticorpo que se liga ao peptídeo beta amiloide ($A\beta$) e é covalentemente ligado a uma ou
5 mais moléculas de polietileno glicol (PEG).

O peptídeo $A\beta$ em forma circulante é composto de 39-43 amino-
ácidos (principalmente 40 ou 42 aminoácidos) resultantes da clivagem de
uma proteína precursora, proteína precursora do amiloide (APP). Conversão
de $A\beta$ de formas solúveis para insolúveis com conteúdo de folha β alto e sua
10 deposição como placas neuríticas e cerebrovasculares no cérebro parece
estar associado às várias condições e doenças, incluindo doença de Alzhei-
mer, síndrome de Down, e angiopatia amiloide cerebral (CAA). Prevenção
e/ou reversão da deposição de $A\beta$ pode tratar condições associadas com o
peptídeo $A\beta$.

15 Agentes terapêuticos que afetam a deposição de $A\beta$ incluem an-
ticorpos para peptídeo $A\beta$, tais como os anticorpos humanizados e fragmen-
tos debatidos em WO 2001/62801, WO 2004/071408 e Tamura, Y., et al,
Neurobiol. of Dis. (2005) 20:541-545.

Embora muitos anticorpos e seus derivados possam ser úteis na
20 diagnose e terapia, a farmacocinética ideal de anticorpos frequentemente
não é alcançada para uma aplicação particular. Anticorpos terapêuticos vi-
sados no combate de várias condições e doenças associadas ao peptídeo
 $A\beta$ são em geral imunoglobulinas com regiões Fc intactas. Regiões Fc são
responsáveis para prolongar a meia-vida do anticorpo no plasma. Porém,
25 esta prolongação pode ser uma desvantagem visto que impede o anticorpo
que está ligado ao peptídeo alvo de ser eficazmente limpadado, resultando no
complexo de antígeno-anticorpo estando presente na circulação de plasma
por quantidades estendidas de tempo. Administração subsequente do anti-
corpo leva à acumulação também do complexo indesejado no plasma. A
30 porção Fc de um anticorpo pode ter certas funções efetoras indesejadas e
pode necessitar ser modificada para eliminar tais funções. Também, a por-
ção Fc adiciona tamanho substancial à terapêutica geral que frequentemente

cria problemas associados à rota de liberação, dispositivos de liberação, e processos de fabricação em escala.

Fragmentos de anticorpo sem uma porção Fc, incluindo Fabs, foram estudados *in vivo* para determinar se tais fragmentos poderiam ser terapêuticas potenciais. Porém, estudos sugerem que a utilidade das terapias que envolvem fragmentos tais como Fabs é limitada devido a uma taxa de liberação rápida e uma meia-vida curta. Portanto, há uma necessidade por uma molécula de anticorpo de peptídeo anti-A β terapêutica ativa com farmacocinética e farmacodinâmica que permitem um regime de doseamento melhorado ao mesmo tempo evitando os efeitos colaterais potenciais que podem ser criados através da formação de complexo no plasma e funções efectoras potenciais.

A presente invenção supera vários problemas associados aos anticorpos terapêuticos ou fragmentos de anticorpo que podem ser alvejados para peptídeo A β . Os compostos da presente invenção abrangem um fragmento de anticorpo que se liga a A β e é covalentemente ligado a uma ou mais moléculas de polietileno glicol (PEG). Estes compostos podem ser produzidos em sistemas de células bacterianas ou de levedura, que elimina vários problemas associados à produção de anticorpos em linhagens celulares mamíferas tais como problemas de custo, problemas de purificação, e problemas de contaminação de antígeno endogenamente produzido. Além disso, os compostos da presente invenção podem ser administrados subcutaneamente e têm um perfil ideal de farmacocinética (PK) e farmacodinâmica (PD) ao mesmo tempo preservando a afinidade e seletividade do fragmento de anticorpo para A β .

Totalmente imprevisível e inesperadamente, os requerentes também descobriram que covalentemente ligando moléculas de PEG à região de determinação de complementaridade (CDR) do fragmento de anticorpo não alterou a atividade, afinidade ou seletividade do fragmento de anticorpo para A β .

Esta invenção fornece uma molécula compreendendo um fragmento de anticorpo que especificamente se liga ao peptídeo A β humano en-

tre as posições de aminoácido 13-28, em que o fragmento de anticorpo é covalentemente ligado a uma molécula de PEG. Preferivelmente, o fragmento de anticorpo é um fragmento Fab.

Em uma modalidade, a invenção fornece uma molécula compreendendo um fragmento de anticorpo tendo uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que a região variável de cadeia leve compreende regiões de CDR com as sequências de aminoácido a seguir: 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 de CDR com as sequências de aminoácido a seguir: 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). Preferivelmente, uma tal molécula tem uma molécula de PEG que é covalentemente ligada ou à região variável de cadeia pesada ou à região variável de cadeia leve do fragmento de anticorpo. Mais preferivelmente, uma tal molécula tem uma molécula de PEG que é covalentemente ligada a uma CDR. Até mesmo mais preferivelmente, uma tal molécula tem uma molécula de PEG que é covalentemente ligada a um resíduo de cisteína dentro da CDR. O mais preferivelmente, uma tal molécula tem uma molécula de PEG que é covalentemente ligada a uma CDRH2: QINIRGCNTYYPDTVKG (SEQ ID NO: 10) da região variável de cadeia pesada do fragmento de anticorpo.

Em outra modalidade, a invenção fornece uma molécula compreendendo um fragmento de anticorpo que tem uma região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 1, e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 2. Preferivelmente, uma tal molécula tem uma molécula de PEG que é covalentemente ligada ou à região variável de cadeia pesada ou à região variável de cadeia leve do fragmento de anticorpo. Mais preferivelmente, uma tal molécula tem uma molécula de PEG que é covalentemente ligada a uma CDR de uma região variável de cadeia pesada do fragmento de anticorpo. Até mesmo mais preferivelmente, uma tal molécula tem uma molécula de PEG que é covalentemente ligada a um resíduo de cisteína dentro da

CDR de uma região variável de cadeia pesada do fragmento de anticorpo. O mais preferivelmente, uma tal molécula tem uma molécula de PEG que é covalentemente ligada à cisteína na posição de aminoácido 56 da região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 2.

5 Em outra modalidade, a invenção fornece uma molécula compreendendo um fragmento Fab ou um fragmento ScFv, em que o fragmento Fab ou fragmento ScFv é covalentemente ligado a uma molécula de PEG e tem uma região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 1, e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 2. Preferivelmente, uma tal molécula
10 tem uma molécula de PEG que é covalentemente ligada à cisteína na posição de aminoácido 56 da região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 2. Também preferivelmente, em uma tal molécula o peso molecular do PEG é cerca de 0,5 kD a cerca de 30 kD, mais preferivelmente 20 kD.

 Em outra modalidade a invenção fornece uma molécula compreendendo um fragmento de anticorpo com uma região variável de cadeia
15 leve da SEQ ID NO: 1 e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 2, em que o dito fragmento de anticorpo é covalentemente ligado a uma molécula de PEG de 20 kD na posição 56 da região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 2. Preferivelmente, em uma tal molécula a molécula de
20 PEG é covalentemente ligada por meio de uma ligação de maleimida.

 Em outra modalidade a invenção fornece uma molécula compreendendo um fragmento de anticorpo que especificamente se liga ao peptídeo A β humano entre as posições de aminoácido 13-28, em que o fragmento de anticorpo é covalentemente ligado a uma molécula de PEG e tem
25 uma região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 1, e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 3. Preferivelmente, uma tal molécula tem uma molécula de PEG que é covalentemente ligada à região de dobradiça do fragmento de anticorpo. Mais preferivelmente, a PEG é covalentemente ligado à região de dobradiça por meio de uma ligação de maleimida.

30 A invenção também inclui uma molécula compreendendo fragmentos de anticorpo, preferivelmente fragmentos de anticorpo humanizado em que uma molécula de PEG é covalentemente ligada ao fragmento de

anticorpo que resulta em uma molécula terapêutica ativa com farmacocinética e farmacodinâmica que permitem regime de doseamento semanal, ao mesmo tempo minimizando os efeitos colaterais potenciais que podem ser criados através de formação de complexo no plasma e preservando ou melhorando a atividade, afinidade e seletividade do fragmento de anticorpo para A β .

A invenção também inclui métodos de tratar, prevenir, ou reverter condições e doenças associadas ao peptídeo A β , incluindo doença de Alzheimer pré-clínica e clínica, síndrome de Down, e angiopatia amilóide cerebral pré-clínica e clínica (CAA), déficit cognitivo, acidente vascular cerebral, hemorragia cerebral, e debilitação mental geral. Estes métodos compreendem administrar a um sujeito uma quantidade eficaz de uma molécula descrita e reivindicada aqui.

Esta invenção fornece uma molécula compreendendo um fragmento de anticorpo que especificamente se liga ao peptídeo A β entre as posições de aminoácido 13-28, em que o fragmento de anticorpo é covalentemente ligado a uma molécula de PEG. Descobriu-se que ligando covalentemente uma molécula de PEG a um fragmento de anticorpo que liga A β não altera negativamente a atividade, afinidade ou seletividade do fragmento de anticorpo para A β . Mais surpreendentemente, descobriu-se que ligando covalentemente uma molécula de PEG tendo um peso molecular até 20 kD a uma CDR de um fragmento de anticorpo que liga A β também não altera negativamente a atividade, afinidade ou seletividade do fragmento de anticorpo para peptídeo A β . Estes fragmentos de anticorpo podem ser administrados subcutaneamente e têm um perfil de PK/PD melhorado para uso terapêutico que suporta um regime de doseamento flexível. Além disso, estes fragmentos de anticorpo podem ser produzidos em sistemas de células bacterianas ou célula de levedura que eliminam vários problemas associados à produção de anticorpo de comprimento total em células mamíferas. Os fragmentos de anticorpo peguado desta invenção oferecem a oportunidade para impedir e tratar, profilática e terapeuticamente, condições em humanos associadas ao peptídeo A β .

Um anticorpo de comprimento total como existe naturalmente é uma molécula de imunoglobulina compreendida de quatro cadeias de peptídeo, duas cadeias pesadas (H) (cerca de 50-70 kDa quando comprimento total) e duas cadeias leves (L) (cerca de 25 kDa quando comprimento total) interconectadas através de ligações de dissulfeto. A porção amino-terminal de cada cadeia inclui uma região variável de cerca de 100-110 ou mais aminoácidos primariamente responsáveis pelo reconhecimento do antígeno. A porção carbóxi-terminal de cada cadeia define uma região constante primariamente responsável pela função efetora.

Cadeias leves são classificadas como capa ou lambda e caracterizam-se por uma região constante particular. Cada cadeia leve é compreendida de uma região variável de cadeia leve N-terminal (aqui "LCVR") e uma região constante de cadeia leve compreendida de um domínio, CL. Cadeias pesadas são classificadas como gama, mu, alfa, delta, ou épsilon, e define o isótipo do anticorpo como IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, respectivamente e vários destes podem ser também divididos em subclasses (isótipos), por exemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Cada tipo de cadeia pesada é caracterizado por uma região constante particular. Cada cadeia pesada é compreendida de uma região variável de cadeia pesada N-terminal (aqui "HCVR") e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada é compreendida de 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 de HCVR e LCVR podem ser também subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões de determinação de complementaridade ("CDRs"), entremeadas com as regiões que são mais conservadas, denominadas regiões de estrutura ("FRs"). Cada HCVR e LCVR é composta de três CDRs e quatro FRs, dispostas do término amino ao término carbóxi na ordem a seguir: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Aqui as 3 CDRs da cadeia pesada são referidas como "CDRH1, CDRH2, e CDRH3" e as 3 CDRs da cadeia leve são referidas como "CDRL1, CDRL2 e CDRL3". As CDRs contêm a maioria dos resíduos que formam interações específicas com o antígeno. A numeração e posicionamento dos

resíduos de aminoácido de CDR dentro das regiões HCVR e LCVR são de acordo com a convenção de numeração de Kabat bem conhecida.

A região variável de cada par de cadeia leve-pesada forma um sítio de ligação de antígeno do anticorpo. Como aqui usado, a "porção de
 5 ligação de antígeno" ou "região de ligação de antígeno" ou "domínio de ligação de antígeno" ou "sítio de ligação de antígeno" referem-se alternadamente àquela porção de uma molécula de anticorpo que contém os resíduos de aminoácido que interagem com um antígeno e conferem no anticorpo sua especificidade e afinidade pelo antígeno. Esta porção de anticorpo inclui os
 10 resíduos de aminoácido de "estrutura" necessárias para manter a conformação apropriada dos resíduos de ligação de antígeno. Preferivelmente, as regiões de estrutura dos anticorpos da invenção são de origem humana ou substancialmente de origem humana (pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de origem humana) e segue a numeração de Kabat.
 15 Alternativamente, a região de ligação de antígeno pode ser derivada de sequência humana.

Como aqui usado, o termo "fragmento de anticorpo" refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retém a habilidade para especificamente ligar a um antígeno (por exemplo, A β). Exemplos de moléculas
 20 abrangidas dentro do termo "fragmento de anticorpo" de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente que consiste nos domínios VL, VH, CL e CH1; (ii) um fragmento F(ab')₂, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ligação em ponte de dissulfeto na região de dobradiça; (iii) um fragmento Fd que consiste nos
 25 domínios VH e CH1; (iv) um fragmento Fv que consiste nos domínios VL e VH de um braço simples de um anticorpo, e (v) um fragmento dAb (Ward, e outros, (1989) *Nature* 341:544-546) que consiste em um domínio VH. Além disso, embora os dois domínios do fragmento Fv, VL e VH sejam codificados por genes separados, eles podem ser unidos, usando métodos recombinantes,
 30 tes, por um ligador sintético que os permite serem feitos como uma cadeia de proteína simples na qual as regiões VL e VH paream-se para formar moléculas monovalentes (conhecidas como cadeia simples Fv (scFv); vide, por

exemplo, Bird e outros (1988) *Science* 242:423-426; e Huston e outros (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Tais anticorpos de cadeia simples são também intencionados ser abrangidos dentro do termo "fragmento de anticorpo". Outras formas de anticorpos de cadeia simples, tais como diacorpos, são também abrangidas pelo termo "fragmento de anticorpo". Diacorpos são proteínas ligadoras bivalentes, biespecíficas em que os domínios VH e VL são expressados em uma cadeia de polipeptídeo simples, mas usando um ligador que é muito curto para permitir pareamento entre os dois domínios na mesma cadeia, assim forçando os domínios parearem-se com domínios complementares de outra cadeia e criando dois sítios de ligação de antígeno (vide por exemplo, Holliger, P., e outros (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R. J., e outros (1994) *Structure* 2:1121-1123).

Ainda também, um anticorpo ou fragmento de anticorpo do mesmo pode fazer parte de uma molécula de imunoadesão maior, formada por associação covalente ou não-covalente do anticorpo ou fragmento de anticorpo com uma ou mais outras proteínas ou peptídeos. Exemplos de tais moléculas de imunoadesão incluem o uso da região de núcleo de estreptavidina para fazer uma molécula de scFv tetramérica (Kipriyanov, S. M., e outros (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) e uso de um resíduo de cisteína, um peptídeo marcador e um marcador de poli-histidina C-terminal para fazer as moléculas de scFv bivalentes e biotinizadas (Kipriyanov, S. M., e outros (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058). Fragmentos de anticorpo, tais como fragmentos Fab e F(ab')₂, podem ser preparados de anticorpos inteiros usando técnicas convencionais, tais como digestão com papaína ou pepsina, respectivamente, de anticorpos inteiros. Além disso, anticorpos, fragmentos de anticorpo e moléculas de imunoadesão podem ser obtidos usando técnicas de DNA recombinante padrões, como são bem conhecidas na técnica. Anticorpos, fragmentos de anticorpo e moléculas de imunoadesão podem ou podem não ser glicosiladas e ainda enquadrar-se nos limites da invenção. Preferivelmente, o fragmento de anticorpo é um fragmento Fab.

O termo "anticorpo humanizado" refere-se a um anticorpo que é parcial ou completamente composto de sequências de aminoácido derivadas de uma linhagem germinal de anticorpo humana ou uma sequência rearranjada e feita alterando a sequência de um anticorpo que tem as CRDs não-humanas. As regiões de estrutura das regiões variáveis podem ser substituídas por regiões de estrutura humana correspondentes. As regiões de estrutura humana incluem regiões de estrutura genômica, como também aquelas contendo uma ou mais substituições de aminoácido. Em particular, tais substituições incluem mutações em que um aminoácido em uma posição particular na estrutura humana é substituído com o aminoácido da posição correspondente da estrutura natural para a CDR não-humana. Por exemplo, um anticorpo humanizado tendo CDRs de camundongo pode conter uma ou mais substituições que substituem um aminoácido de estrutura humana particular com o aminoácido de estrutura de camundongo correspondente. Referências também descrevendo os métodos envolvidos na humanização de um anticorpo de camundongo que podem ser usados são, por exemplo, Queen e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2869, 1991; Pat. U. S. 5.693.761; Pat. U. S. 4.816.397; Pat. U. S. 5.225.539; programas de computação ABMOD e ENCAD como descritos em Levitt, M., *J. Mol. Biol.* 168:595-620, 1983; humanização pode ser essencialmente executada seguindo o método de Winter e colaboradores (Jones e outros, *Nature*, 321:522-525, 1986; Riechmann e outros, *Nature*, 332:323-327, 1988; Verhoeven e outros, *Science*, 239:1534-1536, 1988). Preferivelmente, um anticorpo da invenção é um fragmento de anticorpo humanizado. Mais preferivelmente, um anticorpo da invenção é um fragmento Fab de anticorpo humanizado.

A presente invenção também inclui fragmentos de anticorpo que são covalentemente ligados a uma ou mais moléculas de PEG. É intencional que os termos "polietileno glicol" e "PEG" sejam usados alternadamente e refiram-se a polietileno glicol ou um derivado do mesmo como conhecido na técnica (vide, por exemplo, Patentes U. S.: 5.445.090; 5.900.461; 5.932.462; 6.436.386; 6.448.369; 6.437.025; 6.448.369; 6.495.659; 6.515.100 e 6.514.491). Preferivelmente, PEG é covalentemente ligado a um

ou mais resíduos de lisina ou cisteína do fragmento de anticorpo. Mais preferivelmente, PEG é covalentemente ligado a um ou mais resíduos de lisina ou cisteína na região variável de cadeia pesada do fragmento de anticorpo. Até mesmo mais preferivelmente, PEG é covalentemente ligado a um ou mais
5 resíduos de lisina ou cisteína dentro da CDR do fragmento de anticorpo. O mais preferivelmente, PEG é ligado a um resíduo de cisteína na posição de aminoácido 56 da região variável de cadeia pesada da dita SEQ ID NO: 2. Alternativamente, as moléculas de PEG podem ser ligadas ao fragmento de anticorpo por meio de um ligador ou molécula espaçadora à região de do-
10 bradiça do fragmento de anticorpo. Adição de ligadores e moléculas espaçadoras às regiões de dobradiça é bem conhecida na técnica. Além disso, um PEG pode ser covalentemente ligado a aminoácidos não-naturais modificados do fragmento de anticorpo por técnicas bem conhecidas na técnica.

Em sua forma típica, "PEG" é um polímero linear com grupos
15 hidroxila terminais e tem a fórmula $\text{HO-CH}_2\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-OH}$ onde n é de cerca de 8 a cerca de 4000. O hidrogênio terminal pode ser substituído com um grupo protetor tal como um grupo alquila ou alcanol (M-PEG). Preferivelmente, PEG tem pelo menos um grupo hidróxi, mais preferivelmente é um grupo hidróxi terminal. É este grupo hidróxi que é preferivel-
20 mente ativado para reagir com o peptídeo. Uma variedade de modificações químicas é usada para preparar um derivado de PEG ativo com um grupo funcional, tal como carbonato ativo, éster ativo, aldeído, tresilato, ou usando PEG-propionaldeído adequado para acoplar a uma molécula alvo dado. O derivado de PEG ativado é depois covalentemente ligado a um grupo reativo
25 no fármaco de polipeptídeo. Há muitas formas de PEG úteis para a presente invenção. Numerosos derivados de PEG existem na técnica e são adequados para o uso na invenção. A molécula de PEG covalentemente ligada a um fragmento de anticorpo da presente invenção não é intencionada ser limitada a um tipo ou tamanho particulares. O peso molecular do PEG é pre-
30 ferivelmente de cerca de 0,5 quilodáltons (kD) a cerca de 100 kD e mais preferivelmente de cerca de 5 kD a cerca de 30 kD e o mais preferivelmente de cerca de 1 kD a cerca de 20 kD. PEG pode ser linear ou ramificado e o

fragmento de anticorpo de peptídeo anti-A β da invenção pode ter 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 moléculas de PEG ligadas ao peptídeo. É muito preferível que haja um fragmento de anticorpo de molécula de PEG; porém, quando mais de uma molécula de PEG por molécula de peptídeo estiver presente, prefere-se que

5 haja não mais que seis. Contempla-se também que ambas as extremidades da molécula de PEG podem ser adaptadas para reticular duas ou mais moléculas de fragmento de anticorpo de peptídeo anti-A β junto. Métodos de ligar moléculas de PEG a proteínas, anticorpos e fragmentos dos mesmos, são bem conhecidos na técnica.

10 O termo " K_D ", como aqui usado, é intencionado referir-se à constante de dissociação de uma interação de anticorpo-antígeno particular. É calculada pela fórmula:

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

O termo " k_{on} " como aqui usado é intencionado referir-se à constante de taxa de associação, ou taxa de reação específica, da reação direta, ou formadora de complexo, medida em unidades: $M^{-1}\text{sec}^{-1}$. O termo " k_{off} ", como aqui usado, é intencionado referir-se à constante de taxa de dissociação, ou taxa de reação específica, para dissociação de um anticorpo do complexo de anticorpo/antígeno, medida em unidades: sec^{-1} .

15

20 O termo "especificamente liga" como aqui usado refere-se à situação em que um membro de um par de ligação específico não liga significativamente às moléculas diferentes de seu(s) par(es) de ligação específico(s). O termo é também aplicável onde, por exemplo, um domínio de ligação de antígeno de um anticorpo da invenção é específico para um epitopo particular que é carregado por vários antígenos em cujo caso o anticorpo específico que carrega o domínio de ligação de antígeno poderá ligar aos

25 vários antígenos que carregam o epitopo. Consequentemente, uma molécula da invenção especificamente liga-se ao peptídeo A β enquanto especificamente não se liga à APP. Além disso, uma molécula da invenção especificamente

30 liga-se entre um epitopo A β linear, não-linear ou conformacional compreendendo os aminoácidos HHQKLFFAEDVGSNK (13-28) (SEQ ID NO: 4).

O termo "atividade" em referência a uma molécula da presente invenção inclui, mas não é limitado a, afinidade e especificidade de epítopo/antígeno, habilidade para neutralizar ou antagonizar uma atividade de peptídeo A β *in vivo* ou *in vitro*, IC₅₀, estabilidade *in vivo* do anticorpo e as propriedades imunogênicas do anticorpo. Outras propriedades ou características biológicas identificáveis de um anticorpo reconhecidas na técnica incluem, por exemplo, reatividade cruzada, (isto é, com homólogos não-humanos do peptídeo alvejado, ou com outras proteínas ou tecidos, em geral), e habilidade para preservar níveis de expressão altos da proteína nas células mamíferas. As propriedades ou características acima mencionadas podem ser observadas, medidas ou avaliadas usando as técnicas reconhecidas na técnica incluindo, mas não limitadas a, ELISA, ELISA competitivo, análise de ressonância de plasmon de superfície Biacore ou KinExA, ensaios de neutralização *in vitro* ou *in vivo* sem limite, ligação de receptor, produção e/ou secreção de citocina ou de fator de crescimento, transdução de sinal e imunistoquímica com seções de tecido de fontes diferentes incluindo humana, primata, ou qualquer outra fonte.

Os termos "indivíduo", "sujeito", e "paciente", usados alternadamente aqui, referem-se a um mamífero, preferivelmente humano. Em uma certa modalidade, o sujeito é também caracterizado com uma doença ou distúrbio ou condição que se beneficiaria de uma atividade diminuída do peptídeo A β .

Como aqui usado, as expressões "célula hospedeira", "linhagem de célula hospedeira", e "cultura de célula hospedeira" são usadas alternadamente e incluem uma célula individual ou cultura de células que é um recipiente de qualquer polinucleotídeo isolado da invenção ou qualquer vetor(es) recombinante(s) compreendendo uma sequência que codifica uma HCVR, LCVR ou anticorpo monoclonal da invenção. Células hospedeiras incluem progênie de uma célula hospedeira simples. A progênie pode não ser completamente idêntica, em morfologia ou em complemento de DNA total, à célula-pai original devido à mutação e/ou alteração natural, acidental, ou deliberada. Uma célula hospedeira inclui células transformadas, transdu-

zidas ou infetadas com um vetor recombinante ou um polinucleotídeo que expressa um fragmento de anticorpo da invenção ou uma cadeia leve ou cadeia pesada do mesmo. Uma célula hospedeira compreendendo um vetor recombinante da invenção, um estavelmente incorporado no cromossomo hospedeiro ou não, pode também ser referida como uma "célula hospedeira recombinante". Células preferidas para gerar células hospedeiras da invenção são células CHO (por exemplo, ATCC CRL-9096), células NS0, células SP2/0, células COS (ATCC, por exemplo, CRL-1650, CRL-1651) e HeLa (ATCC CCL-2). Células hospedeiras adicionais para o uso na invenção incluem células de planta, células de levedura, outras células mamíferas e células procarióticas. Mais preferivelmente, as células para o uso na invenção são células de levedura ou procarióticas.

O termo "condição ou doença relacionada ao peptídeo A β " ou "condições associada à doença com atividade de A β " é significado incluir todas as condições, distúrbios e doenças que são associados a: 1) o desenvolvimento de placas β -amilóides no cérebro, 2) a síntese de formas anormais de A β , 3) a formação de formas particularmente tóxicas de A β , ou 4) taxas anormais de síntese, degradação, ou liberação de A β . Condições e doenças tais como doença de Alzheimer, síndrome de Down, angiopatia amilóide cerebral, certas demências vasculares, e prejuízo cognitivo moderado são conhecidas ou suspeitadas de ter uma tal relação a A β .

Esta invenção fornece uma molécula compreendendo um fragmento de anticorpo que especificamente liga-se ao peptídeo A β entre as posições de aminoácido 13-28, em que o fragmento de anticorpo é covalentemente ligado a uma molécula de PEG. O fragmento de anticorpo é preferivelmente um fragmento de anticorpo humanizado, tal como fragmento Fab e/ou fragmento scFv. O mais preferivelmente o fragmento de anticorpo é um fragmento Fab. Ligação específica das moléculas da invenção ao peptídeo A β permite usar as ditas moléculas como uma terapêutica para doenças e distúrbios associados ao peptídeo A β , isto é, condições, doenças ou distúrbios que se beneficiam da inibição de uma atividade biológica do peptídeo A β .

Em uma modalidade da invenção, o fragmento de anticorpo tem uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que a região variável de cadeia leve compreende regiões de CDR com as sequências de aminoácido a seguir: CDRL1: SSSQSLIYSDGNAYLH
 5 (SEQ ID NO: 6), CDRL2: KVSNRFS (SEQ ID NO: 7) e CDRL3: TQS-THSPWT (SEQ ID NO: 8) e/ou em que a região variável de cadeia pesada compreende regiões de CDR com as sequências de aminoácido a seguir: CDRH1: GYTFSRYSMS (SEQ ID NO: 9), CDRH2: QINIRGCNTYYPDTVKG (SEQ ID NO: 10) ou QINIRGNNTYYPDTVKG (SEQ ID NO: 11), e CDRH3:
 10 GDF (SEQ ID NO: 12). Preferivelmente, as seis CDRs de um fragmento de anticorpo da invenção existem junto. A composição compreendendo uma CDR da invenção em geral será uma sequência de cadeia pesada ou leve de anticorpo ou uma porção substancial da mesma em que a CDR está localizado em uma localização consistente com a numeração de Kabat. As três
 15 regiões de CDR para cada cadeia, pesada e leve, são fornecidas em uma região de estrutura como uma sequência contígua representada pela fórmula a seguir: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. A cadeia pesada ou cadeia leve FR1, FR2, FR3 e FR4 se combinam para formar a região de estrutura completa de um fragmento de anticorpo quando disposta como uma
 20 sequência contígua com as CDRs na ordem declarada. Preferivelmente, as regiões de estrutura de um anticorpo da invenção são de origem humana ou substancialmente de origem humana (isto é, mais que cerca de 80, 82, 85, 87, 90, 92, 95, 97%).

Preferivelmente, o fragmento de anticorpo da invenção compreende uma LCVR compreendendo um peptídeo da sequência a seguir:

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCSSSQSLIYSDGNAYLHWYLQ
 KPGQSPQLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCT
QSTHSPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 1)

e uma HCVR compreendendo um peptídeo com uma sequência selecionada do grupo que consiste nas sequências a seguir:

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFSRYSMSWVRQAP
 GKGLEWVGQINIRGCNTYYPDTVKGRTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTA

VYYCTTGDFWGQGT¹LVTVSS (SEQ ID NO: 2)

EVQLVESGGGLV²KPGGSLRLSCAASG³YTFSRYSMSWVRQAP
GKGLEWVGQINIRGNNTYYPD⁴TVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTA
VYYCTTGDFWGQGT⁵LVTVSS (SEQ ID NO: 3)

- 5 Alternativamente, o fragmento de anticorpo compreende um LCVR compreendendo um peptídeo com uma sequência que consiste na SEQ ID NO: 1 e uma HCVR compreendendo um peptídeo com uma sequência selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 3, em que a HCVR e LCVR existem junto em um fragmento de anticorpo. O
- 10 artesão versado apreciará que os fragmentos de anticorpo da invenção não são limitados às sequências específicas de HCVR e LCVR, mas também incluem variantes destas sequências que, quando presentes em uma molécula da invenção, retêm ou melhoram sob habilidade de ligação do antígeno e pelo menos uma outra propriedade funcional do anticorpo-pai, por exem-
- 15 plo, especificidade do epitopo, habilidade para competir com o anticorpo-pai para ligar ao peptídeo A β , valores de IC₅₀ e/ou K_D ou k_{off} para ligar ao peptídeo A β .

- Em outra modalidade da invenção, toda ou uma porção da região variável é limitada por uma sequência de LCVR particular como mostrada
- 20 por uma SEQ ID NO: 1 e HCVR como mostrada na SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 3 e é também caracterizado por antagonizar ou neutralizar pelo menos uma atividade do peptídeo A β *in vivo* ou *in vitro*. Um anticorpo da invenção, em que toda ou uma porção da região variável é limitada por uma sequência particular como mostrada por uma LCVR SEQ ID NO: 1 e HCVR
- 25 SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 3 é aqui também caracterizado por especificamente ligar ao peptídeo A β humano mas não ligando à APP humana.

- Em um aspecto da presente invenção, PEG (ou um derivado do mesmo) é covalentemente ligado a um ou mais resíduos de lisina, cisteína ou de aminoácidos modificados não-naturais de um fragmento de anticorpo.
- 30 Preferivelmente, a molécula de PEG é covalentemente ligada ou à região variável de cadeia pesada ou à região variável de cadeia leve do fragmento de anticorpo. Mais preferivelmente, uma tal molécula tem uma molécula de

PEG que é covalentemente ligada a uma CDR de uma região variável de cadeia pesada do fragmento de anticorpo. O mais preferivelmente, uma tal molécula tem uma molécula de PEG que é covalentemente ligada à cisteína na posição de aminoácido 56 da região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 2. Alternativamente, as moléculas de PEG podem ser ligadas ao fragmento de anticorpo Fab de peptídeo anti-A β por meio de um ligador ou molécula espaçadora à região de dobradiça do fragmento de anticorpo.

Em outro aspecto da presente invenção, uma molécula de PEG é covalentemente ligada a um ou mais resíduos de lisina, cisteína ou de aminoácidos modificados não-naturais engenheirados do anticorpo da presente invenção para substituir uma glicosilação presente nas moléculas de anticorpo sem significativamente afetar a afinidade e a seletividade do fragmento de anticorpo para A β . Preferivelmente, a molécula de PEG substitui o sinal de glicosilação na região variável de cadeia pesada ou na região variável de cadeia leve do fragmento de anticorpo. Mais preferivelmente, a molécula de PEG substitui o sinal de glicosilação na CDR de uma região variável de cadeia pesada do fragmento de anticorpo. O mais preferivelmente, a molécula de PEG substitui o sinal de glicosilação na posição 56 da região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 2.

A molécula de PEG covalentemente ligado a um anticorpo na presente invenção não é intencionada a ser limitada a um tipo ou tamanho particulares. O peso molecular de PEG é preferivelmente de cerca de 0,5 kD a cerca de 100 kD, e mais preferivelmente de cerca de 0,5 kD a cerca de 30 kD, e o mais preferivelmente de cerca de 1 kD a cerca de 20 kD. Alternativamente o peso molecular do PEG pode ser selecionado 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. PEG pode ser linear ou ramificado e o anticorpo de peptídeo anti-A β PEGuilados da invenção pode ter mais que uma molécula de PEG ligada ao peptídeo. Preferivelmente, há uma molécula de PEG por anticorpo de peptídeo anti-A β PEGuilados.

O mais preferivelmente, a molécula de anticorpo desta invenção compreende um fragmento de anticorpo com uma região variável de cadeia

leve da SEQ ID NO: 1 e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 2, em que o dito fragmento de anticorpo é covalentemente ligado a uma molécula de PEG de 20 kD na posição 56 da região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 2.

- 5 O epítipo de peptídeo A β antigênico, entre os quais os anticorpos da invenção se ligam, é um epítipo linear, não-linear ou conformacional compreendendo aminoácidos HHQKLVFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 4). Anticorpos que se ligam ao dito epítipo, específica e preferencialmente se ligam ao peptídeo A β quando comparado a sua APP ligante. Os anticorpos
- 10 monoclonais da invenção se ligam ao peptídeo A β pelo menos 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, ou 100 vezes mais (por exemplo, maior afinidade ou maior especificidade) que se ligariam à APP humana; mais preferivelmente pelo menos 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 ou 600 vezes mais que se ligariam à APP, até mesmo mais preferivelmente não se ligam à
- 15 APP em níveis maiores que os níveis de base como determinado, por exemplo, pelo ensaio de ELISA, ensaio de ELISA de competição ou valores de K_D em um ensaio Biacore ou KinExA.

Os fragmentos de anticorpo da invenção se ligam a um epítipo entre os aminoácidos HQKLVFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 5) pelo menos 2,

20 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, ou 100 vezes mais (por exemplo, maior afinidade ou maior especificidade) que um epítipo não compreendendo os aminoácidos HQKLVFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 5). Mais preferivelmente, pelo menos 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 ou 600 vezes mais que com um epítipo não compreendendo os aminoácidos HQKLVFFA-

25 EDVGSNK (SEQ ID NO: 5), até mesmo mais preferivelmente não se liga a um epítipo não compreendendo os aminoácidos HQKLVFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 5) em níveis maiores que os níveis de base como determinado, por exemplo, pelo ensaio de ELISA, ensaio de ELISA de competição ou valores de K_D em um ensaio Biacore ou KinExA.

- 30 Em uma modalidade preferida, a invenção fornece um fragmento de anticorpo que possui uma afinidade de ligação forte para o peptídeo A β , isto é, liga-se ao peptídeo A β , ou uma porção do mesmo, compreenden-

do a sequência HQKLFFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 5) [isto é, anticorpo contata o polipeptídeo de HQKLFFFAEDVGSNK], com uma afinidade de ligação (K_D) para peptídeo A β humano de menos que cerca de 200 pM, 100 pM, 50 pM, 40 pM ou 30 pM, preferivelmente menos que cerca de 20 pM quando medido pelo método de KinExA. Alternativamente, a afinidade de ligação (K_D) para o peptídeo A β humano é entre 0,1 pM - 200 pM. Afinidades de anticorpo podem ser determinadas como descrito nos exemplos aqui abaixo e outros métodos disponíveis na técnica.

A rota de administração de um anticorpo da presente invenção pode ser oral, parenteral, através de inalação, ou tópica. Preferivelmente, os anticorpos da invenção podem ser incorporados em uma composição farmacêutica adequada para administração parenteral. O termo parenteral como aqui usado inclui administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, retal, vaginal, ou intraperitoneal. Liberação sistêmica periférica por injeção intravenosa ou intraperitoneal ou subcutânea é preferida. Mais preferivelmente, a rota de administração de um anticorpo da presente invenção é por meio de injeção subcutânea. Veículos adequados para tais injeções são óbvios na técnica.

O fragmento de anticorpo da presente invenção tem uma meia-vida mais curta que o anticorpo de comprimento total de peptídeo anti-A β correspondente no plasma e é limpaado mais rapidamente do plasma que o anticorpo de comprimento total de peptídeo anti-A β correspondente. Alternativamente, o anticorpo da presente invenção tem uma meia-vida plasmática mais longa que o fragmento Fab de peptídeo anti-A β correspondente, que não está covalentemente ligado a uma molécula de PEG, e é limpaado menos rapidamente do plasma que o fragmento Fab de peptídeo anti-A β correspondente que não está covalente ligado a uma molécula de PEG (Exemplos 1, 2 e 3). O termo "correspondente" em referência a um anticorpo como aqui usado refere-se a um anticorpo com as mesmas LCVR e HCVR. Por exemplo, o anticorpo de comprimento total correspondente em referência a um fragmento Fab de anticorpo tendo uma LCVR da SEQ ID NO: 1 e uma HCVR que consiste na SEQ ID NO: 2 teria a mesma LCVR da SEQ ID NO: 1 e

uma HCVR que consiste na SEQ ID NO: 2 junto com um domínio de Fc intacto.

Em outro aspecto, a presente invenção é direcionada a polinucleotídeos recombinantes que codificam anticorpos que, quando expressos, compreendem a LCVR da SEQ ID NO: 1 e uma HCVR que consiste na SEQ ID NO: 2. Devido à degeneração de códon, outras sequências de polinucleotídeo podem ser facilmente substituídas por aquelas sequências. Polinucleotídeos particularmente preferidos da presente invenção codificam anticorpos que quando expressos, compreendem as CDRs de cadeia leve da SEQ ID NO: 6-8, e CDRs de cadeia pesada da SEQ ID NO: 9, 10 ou 11, e 12, ou quaisquer das regiões variáveis da SEQ ID NO: 1-SEQ ID NO: 3. Exemplos de sequências de polinucleotídeo que codificam para LCVR da SEQ ID NO: 1 e HCVR da SEQ ID NO: 2 são representados na SEQ ID NO: 13 (LCVR) e SEQ ID NO: 14 (HCVR), respectivamente.

Os polinucleotídeos tipicamente também incluirão uma sequência de polinucleotídeo de controle de expressão operavelmente ligada às sequências humanizadas de codificação de imunoglobulina, incluindo regiões de promotor naturalmente associado ou heterólogo. Preferivelmente, as sequências de controle de expressão serão sistemas de promotor eucariótico em vetores capazes de transformar ou transfeccionar células eucarióticas, mas sequências de controle para células procarióticas podem também ser usados. Uma vez o vetor foi incorporado na linhagem de célula hospedeira apropriada, a célula hospedeira é propagada sob condições adequadas para expressar as sequências de nucleotídeo, e, como desejado, a coleta e purificação das cadeias leves, cadeias pesadas, dímeros de cadeia leve/pesada ou anticorpos intactos, fragmentos de ligação ou outras formas de imunoglobulina podem seguir.

As sequências de ácido nucléico da presente invenção capazes de por fim expressar os anticorpos desejados ou fragmentos de anticorpo podem ser formadas de uma variedade de polinucleotídeos diferentes (oligonucleotídeos genômicos ou cDNA, RNA, sintéticos, etc.) e componentes (por exemplo, regiões V, J, D, e C), usando qualquer de uma variedade de

técnicas bem conhecidas. Unir as sequências genômicas e sintéticas apropriadas é um método comum de produção, mas sequências de cDNA podem também ser utilizadas.

Sequências de DNA de região constante humana podem ser isoladas, de acordo com os procedimentos bem conhecidos, de uma variedade de células humanas, mas preferivelmente de células B imortalizadas. Células fontes adequadas para as sequências de polinucleotídeo e células hospedeiras para expressão e secreção da imunoglobulina podem ser obtidas de várias fontes bem conhecidas na técnica.

Além dos anticorpos humanizados ou fragmentos de anticorpo especificamente descritos aqui, outros anticorpos "substancialmente homólogos" modificados podem ser facilmente projetados e produzidos utilizando várias técnicas de DNA recombinante bem conhecidas àqueles versados na técnica. Por exemplo, as regiões de estrutura podem variar das sequências nativas no nível de estrutura primária por várias substituições de aminoácido, adições e deleções terminais e intermediárias, e similares. Além disso, uma variedade de regiões de estrutura humanas diferentes pode ser usada isoladamente ou em combinação como uma base para os anticorpos humanizados da presente invenção. Em geral, as modificações dos genes podem ser facilmente realizadas por uma variedade de técnicas bem conhecidas, tais como mutagênese dirigida.

Como previamente declarado, os polinucleotídeos serão expressados nos hospedeiros após as sequências terem sido operavelmente ligadas (isto é, posicionadas para assegurar o funcionamento de) uma sequência de controle de expressão. Estes vetores de expressão são tipicamente replicáveis nas células hospedeiras ou como epissomas ou como uma parte integrante do DNA cromossômico hospedeiro. Comumente, os vetores de expressão conterão marcadores de seleção, por exemplo, tetraciclina ou neomicina, para permitir detecção daquelas células hospedeiras transformadas com as sequências de DNA desejadas. Vetores de expressão para estas células podem incluir sequências de controle de expressão, tais como uma origem de replicação, um promotor, um intensificador, e sítios de

informação de processamento necessários, tais como sítios de ligação de ribossoma, sítios de *splice* de RNA, sítios de poliadenilação, e sequências terminadoras transcricionais. Sequências de controle de expressão preferidas são promotores derivados dos genes de imunoglobulina, SV40, Adenovírus, Vírus de Papiloma Bovino, citomegalovírus e similares.

Os vetores que contêm as sequências de polinucleotídeo de interesse (por exemplo, as sequências de codificação de cadeia pesada e leve e as sequências de controle de expressão) podem ser transferidos para a célula hospedeira por métodos bem conhecidos, variando dependendo do tipo de célula. Uma variedade de hospedeiros pode ser empregada para expressar os anticorpos da presente invenção usando as técnicas bem conhecidas na técnica. Linhagens celulares preferidas incluem COS, CHO, SP2/0, NS0 (disponíveis de repositórios públicos tais como ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA) e linhagens celulares de levedura. Preferivelmente, uma célula hospedeira da invenção compreende um ou mais vetores ou construtos compreendendo uma molécula de ácido nucléico da presente invenção. A célula hospedeira da invenção é uma célula à qual um vetor da invenção foi introduzido, o dito vetor compreendendo um polinucleotídeo que codifica uma LCVR da invenção e/ou um polinucleotídeo que codifica uma HCVR da invenção. A invenção também fornece uma célula hospedeira à qual dois vetores da invenção foram introduzidos; um compreendendo um polinucleotídeo que codifica uma LCVR de um anticorpo da invenção e um compreendendo um polinucleotídeo que codifica uma HCVR presente em um anticorpo da invenção e cada operavelmente ligado a uma sequência de promotor. Os tipos de célula incluem células mamíferas, bacterianas, vegetais e de levedura. Preferivelmente, a célula é uma célula CHO, uma célula COS, uma célula SP2/0, uma célula NS0, uma célula de levedura ou um derivado ou progênie de qualquer tipo de célula preferido.

Uma vez expressos, os anticorpos intactos, seus dímeros, cadeias leves e pesadas individuais, ou outras formas de imunoglobulina da presente invenção podem ser purificados de acordo com os procedimentos padrões da técnica, incluindo precipitação de sulfato de amônio, permuta de

ions, afinidade, fase reversa, cromatografia de coluna de interação hidrofóbica, eletroforese em gel e similares. Imunoglobulinas substancialmente puras de pelo menos cerca de 90%, 92%, 94% ou 96% de homogeneidade são preferidas, e 98 a 99% ou mais homogeneidade sendo mais preferido, para
5 usos farmacêuticos. Uma vez purificados, parcialmente ou para homogeneidade conforme desejado, os peptídeos podem ser depois usados terapêutica ou profilaticamente, como direcionado aqui.

Vários sintomas que resultam em déficits cognitivos, acidente vascular cerebral, hemorragia cerebral, e debilitação mental geral parecem
10 estar associados às placas neuríticas e cerebrovasculares no cérebro contendo o peptídeo A β . Entre estas condições estão doença de Alzheimer pré-clínica e clínica, síndrome de Down, e angiopatia amilóide cerebral pré-clínica e clínica (CAA). As placas amilóides são formadas de peptídeo A β . Estes peptídeos circulam no sangue e no fluido cérebro-espinhal (CSF), tipicamente em forma complexada com as lipoproteínas. O peptídeo A β em
15 forma circulante é composto de 39-43 aminoácidos (principalmente 40 ou 42 aminoácidos) sendo o resultado da clivagem de uma proteína precursora comum, proteína precursora do amilóide, frequentemente designada APP. Algumas formas de AP solúvel são por si só neurotóxicas e podem determinar a severidade da neurodegeneração e/ou declínio cognitivo (McLean, C.
20 A., e outros, *Ann. Neurol.* (1999) 46:860-866; Lambert, M. P., e outros (1998) 95:6448-6453; Naslund, J., *J. Am. Med. Assoc.* (2000) 283:1571).

Portanto, uma composição farmacêutica compreendendo uma molécula da invenção pode ser útil para o tratamento ou prevenção de con-
25 dições em que a presença de peptídeo A β causa ou contribui para os efeitos patológicos indesejáveis ou diminuição da atividade de peptídeo A β tem um benefício terapêutico em mamíferos, preferivelmente humanos, incluindo, mas não limitados a, doença de Alzheimer clínica ou pré-clínica, síndrome de Down, angiopatia amilóide clínica ou pré-clínica (CAA), Alzheimer pro-
30 drômica, prejuízo cognitivo moderado (MCI) e déficits cognitivos, acidente vascular cerebral, hemorragia cerebral, e debilitação mental geral parecem estar associados às placas neuríticas e cerebrovasculares no cérebro con-

tendo o peptídeo A β . O uso de uma molécula da presente invenção para tratar ou prevenir pelo menos um dos distúrbios acima mencionados em que a atividade do peptídeo A β é prejudicial ou que se beneficia com níveis diminuídos do peptídeo A β bioativo é contemplado aqui. Adicionalmente, o uso de uma molécula da presente invenção para uso na fabricação de um medicamento para o tratamento de pelo menos um dos distúrbios acima mencionados é contemplado.

Como aqui usado, os termos "tratamento", "tratando", e similares, referem-se a obter 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", como aqui usado, inclui administração de um composto, particularmente a um humano, e inclui: (a) inibir a doença, isto é, deter seu desenvolvimento; ou (b) aliviar a doença, isto é, causar regressão da doença ou distúrbio ou aliviar os sintomas ou complicações do mesmo. Os regimes de dosagem podem ser ajustados para fornecer a resposta desejada ótima (por exemplo, uma resposta terapêutica ou profiláctica). Por exemplo, um bolo simples pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas com o passar do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada como indicado pelas exigências da situação terapêutica.

Uma molécula da invenção pode ser incorporada nas composições farmacêuticas adequadas para administração a um sujeito. As moléculas da invenção podem ser administradas sozinhas ou em combinação com um veículo, diluente, e/ou excipiente farmaceuticamente aceitáveis, em doses únicas ou múltiplas. As composições farmacêuticas para administração são projetadas para ser apropriadas para o modo selecionado de administração, e diluente, veículo, e/ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis como agentes dispersantes, tampões, tensoativos, conservantes, agentes solubilizantes, agentes de isotonicidade, agentes estabilizantes e outros são usados quando apropriado (Vide, por exemplo, Exemplo 14 aqui). As ditas composições são projetadas de acordo com as técnicas convencionais como, por exemplo, em Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*,

19ª Edição, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995, que fornece um compêndio de técnicas de formulação como são em geral conhecidas aos praticantes.

5 Uma composição farmacêutica compreendendo uma molécula da presente invenção pode ser administrada a um sujeito em risco ou apresentando patologias como descritas aqui usando técnicas de administração padrões incluindo administração oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual, ou supositório. Preferivelmente, uma molécula da presente invenção pode ser
10 administrada a um sujeito em risco ou apresentando as patologias como descritas aqui por administração subcutânea.

Uma composição farmacêutica da invenção preferivelmente é uma "quantidade terapeuticamente eficaz" ou uma "quantidade profilaticamente eficaz" de uma molécula da invenção. Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, em dosagens e durante
15 períodos de tempo necessários, para alcançar o resultado terapêutico desejado. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma molécula pode variar de acordo com fatores tais como o estado da doença, idade, sexo, e peso do indivíduo, e a habilidade da molécula para suscitar uma resposta desejada no
20 indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz é também uma em que qualquer efeito tóxico ou prejudicial da molécula, é excedido em valor pelos efeitos terapeuticamente benéficos. Uma "quantidade profilaticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, em dosagens e durante períodos de tempo necessários, para alcançar o resultado profilático desejado. Tipica-
25 mente, uma vez que uma dose profilática é usada em sujeitos antes ou em um estágio mais prematuro da doença, a quantidade profilaticamente eficaz será menor que a quantidade terapeuticamente eficaz.

Uma quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz é pelo menos a dose mínima, mas menos que uma dose tóxica, de um agente ativo
30 que é necessário para dar benefício terapêutico a um sujeito. Declarado de outro modo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma molécula da invenção é uma quantidade que, em mamíferos, preferivelmente humanos,

4. diminui a atividade do peptídeo A β , por exemplo, ligando ao peptídeo A β , em que a presença do peptídeo A β causa ou contribui para os efeitos patológicos indesejáveis ou diminuição no peptídeo A β resulta em um efeito terapêutico benéfico em um mamífero, preferivelmente um humano.

5 A rota de administração de uma molécula da presente invenção pode ser oral, parenteral, através de inalação, ou tópica. Preferivelmente, os anticorpos da invenção podem ser incorporados em uma composição farmacêutica adequada para administração parenteral. O termo parenteral como aqui usado inclui administração intravenosa intramuscular, subcutânea retal, 10 vaginal, ou intraperitoneal. Liberação sistêmica periférica por injeção intravenosa ou intraperitoneal ou subcutânea é preferida. Injeção subcutânea é a mais preferida. Veículos adequados para tais injeções são óbvios na técnica.

A composição farmacêutica tipicamente deve ser estéril e estável sob as condições de fabricação e armazenamento no recipiente fornecido, incluindo por exemplo, um frasco vedado ou seringa. Portanto, as composições farmacêuticas podem ser filtradas estéreis após fazer a formulação, ou do contrário feitas microbiologicamente aceitáveis. Uma composição típica para infusão intravenosa poderia ter um volume de até 250-1000 ml de fluido, tal como a solução de Ringer estéril, solução salina fisiológica, solução 15 de dextrose e solução de Hank e uma dose terapeuticamente eficaz, (por exemplo, 1 a 100 mg/ml, ou mais) do agente terapêutico para liberar as dosagens típicas listadas abaixo. A dose pode variar, dependendo do tipo e severidade da doença. Como é bem conhecido nas técnicas médicas, as dosagens para qualquer sujeito depende de muitos fatores, incluindo o tamanho do paciente, área de superfície do corpo, idade, o composto particular a ser administrado, sexo, tempo e rota de administração, saúde geral, e outros fármacos que são administrados simultaneamente. Uma dose típica 25 pode ser, por exemplo, na faixa de 0,001 a 1000 μ g; porém, doses abaixo ou acima desta faixa exemplar são visadas, especialmente considerando os fatores acima mencionados. O regime de dosagem diariamente parenteral 30 pode ser cerca de 0,1 μ g/kg a cerca de 100 mg/kg do peso do corpo total, preferivelmente de cerca de 0,3 μ g/kg a cerca de 10 mg/kg e mais preferi-

velmente de cerca de 1 µg/kg a 1 mg/kg, até mesmo mais preferivelmente de cerca de 0,5 a 10 mg/kg do peso do corpo por dia. Progresso pode ser monitorado por avaliação periódica. Para administrações repetidas durante vários dias ou muito mais tempo, dependendo da condição, o tratamento é repetido até uma supressão desejada dos sintomas da doença ocorrer. Porém, outros regimes de dosagem podem ser úteis e não são excluídos. A dosagem desejada pode ser liberada por uma administração única de bolo, por administrações múltiplas de bolo, ou por administração de infusão contínua da molécula, dependendo do padrão de decadência farmacocinética que o médico quer alcançar.

Estes quantidades sugeridas das moléculas da invenção estão sujeitas a muita descrição terapêutica. O fator chave em selecionar uma dose e programação apropriados é o resultado obtido. Fatores para consideração neste contexto incluem o distúrbio particular sendo tratado, o mamífero particular sendo tratado, a condição clínica do paciente individual, a causa do distúrbio, o sítio de liberação do anticorpo, o tipo particular de anticorpo, o método de administração, a programação de administração, e outros fatores conhecidos aos médicos.

Os agentes terapêuticos da invenção podem ser gelados ou liofilizados para armazenamento e podem ser reconstituídos em um veículo estéril adequado antes do uso. Liofilização e reconstituição podem levar a graus variados de perda de atividade do anticorpo. Dosagens podem ter que ser ajustadas para compensar.

Os exemplos a seguir são intencionados a ilustrar mas não limitar a invenção. Os exemplos aqui abaixo empregam, entre outros, um anticorpo monoclonal murino designado "266" (m266) que foi preparado originalmente através de imunização com um peptídeo composto dos resíduos 13-28 de peptídeo Aβ humano e um fragmento Fab do anticorpo monoclonal murino designado 266 (m266-Fab). O anticorpo é confirmado para imunorreativo com este peptídeo. A preparação de m266 foi previamente descrita. Para covalentemente ligar uma molécula de PEG a m266-Fab, o Fab pode ser mutado para introduzir um resíduo de cisteína em CDR2 (N56C) da variável

de cadeia pesada e PEGuilados de uma maneira mostrada abaixo (Exemplo 4). Como os exemplos aqui descrevem experimentos conduzidos em sistemas murinos, o uso de anticorpos monoclonais murinos é satisfatório. Porém, nos métodos de tratamento da invenção intencionados para o uso humano, formas humanizadas dos anticorpos da presente invenção, ou fragmentos dos mesmos, são preferidas. O 1A1-Fab referido nos exemplos abaixo é um fragmento Fab de anticorpo humanizado compreendendo LCVR da SEQ ID NO: 1 e HCVR da SEQ ID NO: 2.

EXEMPLO 1

10 ESTUDOS DE PK/PD SUBCUTÂNEOS DE PEG DE m266-FAB EM CAMUNDONGOS PDAPP

Camundongos PDAPP transgênicos jovens (3 meses de idade) são usados para investigar a resposta da farmacocinética/farmacodinâmica plasmática de anticorpo e complexo de anticorpo-A β . Vários anticorpos são

15 investigados incluindo 266 Fab de camundongo (m266-Fab), PEG de m266-Fab+5KD, PEG de m266-Fab+10KD, PEG de m266-Fab+20KD, e anticorpo de IgG de m266 de comprimento total intacto. Camundongos PDAPP+/- são injetados subcutaneamente com 1 mg/kg de anticorpo e o plasma é subsequentemente isolado nos pontos de tempo a seguir: 1, 4, 8, 24, 48, 96, 168,

20 e 240 horas pós-dose. Os animais recebendo o anticorpo de m266-Fab são analisados com pontos de tempo prematuros adicionais devido ao rápido giro desta metade. Os pontos de tempo para o m266-Fab são como segue: 1, 4, 8, 12, 16, 24, e 48 horas pós-dose. Um total de cinco animais é analisado por anticorpo por ponto de tempo. Sangue total é obtido por meio de

25 furo cardíaco com agulhas de calibre 23 conectadas a às seringas 1CC que tinham sido previamente enxaguadas com 0,5 M de EDTA. As amostras de sangue são incubadas em gelo durante o procedimento de isolamento e subsequentemente centrifugadas a 14.000 RPM em uma microcentrifuga refrigerada em 4 graus durante 15 minutos. As amostras de plasma resultantes são aliquotadas e armazenadas a -80 graus.

30

A. Metodologia para análises de PK de Fab

Concentrações de Fab plasmática são determinadas usando

uma captura de antígeno ELISA. Brevemente, as placas são revestidas com conjugado de A β -BSA durante a noite a 4°C ou 1 hora a 37°C depois bloqueados com tampão de caseína Pierce. Padrões, amostras de controle, e amostras de estudo são adicionados às placas seguido por uma incubação de uma hora em temperatura ambiente. Um HRP de anticomundongo de cabra é usado para detecção e uma resposta colorimétrica é desenvolvida com substrato de OPD. As placas são lidas a uma absorbância de A493 com uma referência de A700. Concentrações de imunorreatividade das amostras de plasma são determinadas das curvas padrões preparadas de quantidades conhecidas de m266 Fab em plasma de camundongo usando um algoritmo de 4/5 parâmetros. A faixa de ensaio para o m266 Fab tem 0,05 a 0,5 μ g/ml. A faixa para os Fabs PEGuilados é 0,075 a 0,8 μ g/ml.

As concentrações de imunorreatividade das amostras de plasma são determinadas das curvas padrões preparadas de quantidades conhecidas de m266 Fab em plasma de camundongo usando um algoritmo de 4/5 parâmetros. A faixa de ensaio para o 266 Fab é 0,05 a 0,5 μ g/ml. A faixa para os Fabs PEGuilados é 0,075 a 0,8 μ g/mL. Resultados demonstram claramente que adição de uma molécula de PEG e aumentando o tamanho da molécula de PEG aumentam a retenção do Fabs PEGuilados no plasma (2545 ng/ml após 8 horas para 20K m266-Fab Peguilado) quando comparado aos m266-Fabs não-PEGuilados (350 ng/ml após 8 horas).

B. Ensaio de ELISA de A β de m266

Para medir a quantidade de A β no plasma na ausência ou presença de anticorpo terapêutico (comprimento total ou fragmento Fab) um ensaio de ELISA é desenvolvido e utilizado. Os peptídeos de A β sendo medidos nestes ensaios são A β 1-40 ou A β 1-42 de comprimento total. Placas de ELISA de 96 poços Immulon 4HBX 96 poços (ThermoLabsystems) são revestidas durante a noite a 4 graus com o anticorpo de captura C-terminal (m2G3 para placas de A β 40 ou m21F12 para placas de A β 42) a 10 μ g/ml em PBS (100 μ l por poço). As placas de teste são vedadas para impedir evaporação durante a incubação de noite. No dia seguinte, a solução do poço é removida e os poços são lavados três vezes com PBS (400 μ l por poço) com

- uma lavadora de placa de 96 poços de Labsystems. Tampão de bloqueio (360 µl de 1% de leite-PBS) é adicionado e as placas incubadas a 37 graus durante uma hora. As amostras são preparadas diluindo o plasma nos diluentes de amostra para render o seguinte: 20% de plasma, 0,5 M de guanidina, 5 mM de Tris pH 8,0, 0,5X coquetel de inibidor de protease, 25 µg/ml de m266, e PBS. O volume de plasma usado no ensaio pode necessitar ser diminuído para certos pontos de tempo devido aos níveis altos de peptídeo Aβ presente, e nestas circunstâncias, o volume de plasma residual é ajustado com plasma de rato (porcentagem de volume final é mantida em 20%).
- Os padrões de Aβ são gerados com concentrações que variam de 250 pg/ml a 3,9 pg/ml em diluente padrão (20% de plasma de rato, 0,5 M de guanidina, 5 mM de Tris pH 8,0, e 0,5X coquetel de inibidor de protease Completa EDTA-free (Roche Diagnostics), 25 µg/ml de m266, e PBS). A incorporação de 25 µg/ml de m266 intacto na amostra e diluentes padrões é requerida para neutralizar qualquer interferência negativa que os níveis variáveis dos anticorpos de domínios centrais podem exercer no ensaio. Após bloquear, as placas são lavadas 4 vezes com PBS. As amostras e padrões são carregados em triplicata (100 µl por poço) e a placa é vedada e incubada durante a noite a 4 graus. Na manhã seguinte, as placas são lavadas 4 vezes com PBS-T (PBS + 0,05% Tween-20) e os poços incubados com o anticorpo secundário biotinilado m3D6 (100 µl por poço diluído em 0,5% de BSA/PBS-T) durante 2 horas em temperatura ambiente. Após as placas serem lavadas 4 vezes com PBS-T, elas são incubadas com estreptavidina-polyHRP (1:5000 em 0,5% de BSA/PBS-T) durante 1,5 hora em temperatura ambiente. As placas são lavadas 4 vezes com PBS-T e 100 µl por poço de substrato de TMB (Sigma) são adicionados. A progressão colorimétrica é monitorada a 650 nm em 15, 30, e 60 minutos.

Tabela 1. Resultados farmacodinâmicos: Concentração de Plasma Média para A β 40 (pg/ml)

Tempo (h)	m266 Fab	m266 Fab + 5KD PEG	m266 Fab + 10KD PEG	m266 Fab + 20KD PEG	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

- Além de um programa de doseamento mais flexível que pode ser manipulado com base no tamanho de PEG, os resultados demonstram
- 5 que o complexo Fab-antígeno Peguilado não se acumula na circulação de plasma por quantidades estendidas de tempo como o anticorpo intacto (m266 intacto). O anticorpo intacto prolonga a meia-vida do anticorpo no plasma e resulta no complexo de antígeno:anticorpo estando presente na
- 10 circulação de plasma por quantidades estendidas de tempo (> 240 horas). Os Fabs nativos (m266 Fab) por outro lado têm uma taxa de liberação rápida e uma meia-vida curta (< 24 horas) que os limita como uma terapia. Em contraste, como demonstrado na Tabela 1, os Fabs PEGuilados proporcionam uma molécula de anticorpo com farmacocinética e farmacodinâmica que permitem regime de doseamento melhorado.

15 EXEMPLO 2

ESTUDOS DE PK/PD SUBCUTÂNEOS PEG DE 1A1-Fab EM CAMUNDONGOS PDAPP

- Estudos são executados em camundongos PDAPP transgênicos jovens (3-meses de idade) para investigar a resposta farmacocinética/farmacodinâmica plasmática do anticorpo e complexo de anticorpo-A β .
- 20

- Vários anticorpos são investigados incluindo 1A1-Fab humanizado, 1A1-Fab+5KD PEG, 1A1-Fab+10KD PEG, e 1A1-Fab+20KD PEG. Camundongos PDAPP+/- são injetados subcutaneamente com 1 mg/kg de anticorpo e plasma é subsequentemente isolado em pontos de tempo diferentes dependendo do grupo de injeção de anticorpo. Os pontos de tempo a seguir são usados para os vários anticorpos:

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

- 1A1-Fab+ 5KD PEG são sangrados em 1, 4, 8, 24, 48, 96, e 168 horas pós-dose

1A1-Fab+ 10KD PEG são sangrados em 1, 4, 8, 24, 48, 96, e 168 horas pós-dose

1A1-Fab+ 20KD PEG são sangrados em 1, 8, 24, 48, 96, 168, e 240 horas pós-dose

- Um total de cinco animais é analisado por anticorpo por ponto de tempo. As amostras de plasma resultantes são alíquotadas e armazenadas a -80-graus.

A. Metodologia para análise de PK de Fab

- Concentrações de 1A1 Fab no plasma para 1A1 Fab são determinadas usando um ELISA em sanduíche. As placas são revestidas com IgG capa anti-humano de cabra, padrões, amostras de controle, e amostras de estudo são adicionados às placas depois incubadas durante uma hora em temperatura ambiente. Uma IgG anti-humana de cabra é usado para detecção seguida por OPD para uma resposta colorimétrica. As placas são lidas a uma absorbância de A493 com uma referência de A700.

- Concentrações das amostras no plasma são determinadas das curvas padrão preparadas com quantidades conhecidas de 1A1 Fab no plasma de camundongo usando um algoritmo de 4/5 parâmetros; a faixa para o ensaio de Fab e Fab-5K PEG é 0,003 a 0,3 µg/ml; as faixas para os ensaios de PEG de Fab-10K PEG são 0,006 a 0,2 e 0,04 a 0,4 µg/ml; as faixas para os ensaios de Fab 20K PEG 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 au-

mentando o tamanho da molécula de PEG aumenta a retenção dos Fabs PEGuilados no plasma (77 ng/ml após 96 horas para 1A1 Fab Peguilado de 20K) quando comparado ao 1A1 Fab não Peguilado (não detectável após 24 horas).

5 B. Ensaio de ELISA 1A1 A β

O ELISA é essencialmente igual ao descrito acima para m266. As amostras são preparadas diluindo o plasma nos diluentes de amostra para render o seguinte: 20% de plasma, 0,5 M de guanidina, 5 mM de Tris pH 8,0, 0,5X coquetel de inibidor de protease, 20 μ g/ml de 1A1, e PBS. Os peptídeos A β sendo medidos nestes ensaios são A β 1-40 ou A β 1-42 de comprimento total. A progressão colorimétrica é monitorada a 650 nm em 15, 30, e 60 minutos. Os resultados estão apresentados na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2. Resultados farmacodinâmicos: Concentração de Plasma Média para A β 40 (pg/ml)

Tempo (h)	1A1 Fab	1A1 Fab + 5KD PEG	1A1 Fab + 10KD PEG	1A1 Fab + 20KD PEG
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

15 De uma maneira similar aos m266 Fabs no Exemplo 1, os dados da Tabela 2 demonstram que Fabs humanizados que estão covalentemente ligados a uma molécula de PEG também fornecem um perfil de PK/PD ideal que permite um programa de doseamento flexível ao mesmo tempo preve-

nindo o complexo de anticorpo-antígeno de acumular-se na circulação de plasma por quantidades estendidas de tempo.

EXEMPLO 3

PURIFICAÇÃO DE ANÁLOGOS DE Fab 266 MURINO E 1A1 HUMANIZA-

5 DO

Sobrenadantes da cultura de células transfeccionadas com 266 Fab de camundongo ou 1A1 Fab humanizado e análogos são purificados usando uma estratégia de cromatografia de duas etapas que consiste na cromatografia de permuta de cátion seguida por cromatografia por exclusão de tamanho usando a resina Superdex 75 (GE Healthcare). Seguindo a coleta, o sobrenadante da cultura é concentrado usando TFF e submetido à diálise junto a um volume de excesso de 20 vezes de 10 mM pH 5 de acetato de sódio durante a noite a 4°C. Precipitado é removido através de centrifugação e o sobrenadante é carregado em um leito acumulado de SP sefarose 15 (GE Healthcare) carregado com 10 mM pH 5 de acetato de sódio. A coluna é sucessivamente lavada com 10 mM pH 5 de acetato de sódio contendo quantidades maiores de NaCl até que o fragmento Fab eluísse, em cerca de 90 a 110 mM de NaCl. As frações de coluna contendo Fab ativo são identificadas e agrupadas. O volume é reduzido e tampão trocado (PBS) usando 20 um dispositivo de concentração centrífuga (Millipore). O volume final é ajustado para 13 ml e carregado em uma coluna de tamanho Superdex 75. As frações contendo Fab eluindo em aproximadamente 50 kD são identificadas e agrupadas para outra caracterização e PEGuilação.

EXEMPLO 4

25 PEGUILAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO*

Cisteína de N56C em 1A1-Fab purificados de cultura de célula é bloqueada para PEGuilação. Contas Reduce-Imm® Immobilized Reductant de Pierce são usadas para seletivamente reduzir a Cisteína de N56C. São 30 contas redutoras são extraídas da coluna fornecida pelo fabricante e usadas em um modo em lote. ~4 ml de contas são ativados primeiro com 8 ml de 10 mM de DTT em tampão de Equilíbrio Reduce-IMM #1 (fosfato de sódio + EDTA, pH 8,0) por 30 m. As contas são depois lavadas 3 vezes com PBS.

18 ml de 1A1 N56C Fab a 1,7 mg/ml em PBS pH 7,4 são adicionados às contas e 10 mM de EDTA são adicionados à mistura. A mistura é girada e incubada em temperatura ambiente durante 4-5 horas. Fab é separado das contas usando separadores resina Handee™ e as contas são lavadas com PBS. Fab e as lavagens são combinadas, e reagidas com 5 vezes de excesso molar de Peg-maleimida (20kPEG de NOF; 10kPEG de Sunbio; 5kPEG de Nektar) durante uma hora. A mistura de reação é submetida à diálise junto de 4L de 10 mM de tampão de acetato de sódio pH 5,0 de forma que o Fab e Fab-PEG pode ser capturado em um coluna de sefarose SP que é equilibrada com 10 mM de tampão de acetato de sódio pH 5,0. Fab não-reagido e Fab-PEG são eluídos com um gradiente de sal. Eles são eluídos em 50 mM a 70 mM de NaCl. A proteína é também purificada por cromatografia por exclusão de tamanho (coluna de Superdex75, GE Healthcare) com PBS como a fase móvel. A reação de redução pode ser graduada para cima e para baixo. Métodos similares podem ser usados para preparar 266 Fab N56C murino Peguilado.

As amostras são analisadas com cromatografia por exclusão de tamanho para confirmar a adição de PEG ao Fab. Cromatografia por exclusão de tamanho é executada com coluna de TSK G3000PW XL (Tosoh Bioscience). A coluna é operada a 0,5 ml/min com PBS mais 0,35 M NaCl em pH 7,4 usando uma HPLC analítico série Agilent HP1100 operando a 214 nm. Além disso, as amostras são analisadas com SDS-PAGE. 10 µg de material purificado são carregados em um Gel de 4-12% de NuPage® Bis-Tris e tingidos com SimplyBlue® SafeStain.

25 EXEMPLO 5

MEDINDO AS CONSTANTES DE CINÉTICA COM BIACORE

Instrumento de Biacore® 2000 é também usado para medir a cinética de ligação. O Biacore® utiliza as propriedades ópticas de ressonância de plasmon de superfície para detectar a alteração na concentração de proteína das moléculas interagentes dentro de uma matriz de biossensor de dextrana. Exceto como observado, todos os reagentes e materiais são comprados de Biacore® AB (Upsala, Suécia). Todas as medições são executa-

das as 25°C. As amostras são dissolvidas em tampão de HBS-EP (150 mM de cloreto de sódio, 3 mM de EDTA, 0,005% (p/v) de tensoativo P-20, e 10 mM de HEPES, pH 7,4). Anticorpo capa anti-humano de cabra é imobilizado nas células de fluxo 1 a 4 de um circuito integrado de sensor CM5 a um nível de 8000 unidades de resposta (Ru) usando um kit de acoplamento de amina.

Ligação é avaliada usando ciclos analíticos múltiplos. Cada ciclo é executado a uma taxa de fluxo de 50 µL/minuto e consiste nas etapas a seguir: injeção de ~20 µl de uma composição de ligação de anticorpo a 10 µg/ml visando em uma captura de 400-500 Rus, injeção de 250 µl de Abeta Humano (1-40) (iniciando a 200 nM e usando diluições seriais de duas vezes durante cada ciclo) seguido por 20 minutos para dissociação, e regeneração usando ~30 µl de 10 mM de cloridrato de glicina, pH 1,5. As taxas de associação e dissociação avaliadas durante cada ciclo usando um modelo "de ligação 1:1 (Langmuir)" no software BIAevaluation. Resultados mostram que PEGuilação no sítio de N56C tem pequeno impacto na afinidade da ligação de Fab a Abeta humano.

EXEMPLO 6

MEDINDO AS CONSTANTES DE EQUILÍBRIO COM KinExa

Análise de KinExA é usada como um método ortogonal para medir a afinidade de ligação através da análise de ligação de equilíbrio devido à taxa-off lenta do complexo de antígeno-Fab. Um instrumento de KinExA 3000 (Sapidyne Inst. Inc.) é usado para medir a cinética de ligação. Brevemente, o antígeno é covalentemente acoplado às contas de sefarose e a ligação de Fab livre/Fab-PEG às contas é detectada no instrumento. Para medir Kd, os tubos individuais contendo Fab/Fab-PEG (20 pM ou 500 pM para 1A1-Fab-20kPEG, 5 pM ou 50 pM para 1A1 Fab) com Abeta solúvel humano de antígeno serialmente diluído decrescente (1-40) (0-10 nM), são incubados por 30-50 h a 37°C em PBS contendo 1 mg/ml de BSA para assegurar realização 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. Valores Kd são determinados por Análise de n-Curva usando o software KinExA 3000. Os resultados demonstram que 1A1

Fab liga firmemente a Abeta humano (19 pM), com ~10 vezes de afinidade mais alta comparado ao 266 Fab murino (240 pM). Além disso, ligação covalente de 20K PEG no sítio de N56C não tem nenhum impacto na afinidade de 1A1-Fab (12 pM).

5 EXEMPLO 7

ANÁLISE DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA PRECURSORA DO AMILÓIDE (APP) USANDO ELISA COM BASE EM CÉLULA

Para avaliar a reatividade cruzada de 266 Fabs/mAbs com precursor de Abeta APP, células HEK 293 estavelmente expressando APP (aa 1-751) são usadas. Estas células são criadas clonando o gene de APP (1-751) em um plasmídeo contendo o marcador de resistência de neomicina. O plasmídeo recombinante é transfectado em HEK 293 e as células são selecionadas em 200 µg/ml de G418 para gerar uma linhagem celular estável supraexpressa. Para ensaios de ligação, 75.000 células de APP 751 são

10 banhadas em cada poço de uma placa de 96 poços revestida com PDL. Seguindo incubação durante 2 dias em meios de crescimento (DMEM F12, 5% de FBS, 10 mM de Hepes pH 7,5, 200 µg/ml de G418), o líquido é removido e 20 µg/ml de Fab ou mAb são adicionados em PBS (com Ca/Mg) contendo 10 mg/ml de BSA. Ligação prossegue durante 2 horas em 4°C e as células

15 são lavadas 3X com 10 mg/ml de BSA. Um anticorpo secundário (cadeia leve anticapa conjugada com peroxidase de raiz-forte (hrp)) específico para cadeia leve humana ou de camundongo é adicionado em PBS/BSA (Southern Biotech). Uma diluição de 1:5000 em PBS/BSA é usada para cadeia leve anti-humana e 1:2000 para cadeia leve anticamundongo. Seguindo in-

20 cubação de uma hora a 4°C, as células são lavadas 5X com BSA/PBS. Atividade de Hrp, como uma função de ligação de Fab/mAb à APP, é medida adicionando o substrato TMB durante 10 minutos. As reações são transferidas para uma placa de 96 poços clara e absorbância a 650 nm é medida. Dados indicam que o 1A1-Fab e m266-Fab Peguilados (5 kD, 10 kD, e 20

25 30 kD) conferem seletividade para peptídeo Abeta em APP.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Eli Lilly and Company
 Bales, Kelly R
 Bumol, Thomas F
 5 Chow, Chi-Kin
 Demattos, Ronald B
 Hansen, Ryan
 Kuchibholta, Uma
 Lu, Jirong
 10 McDonnell, Peter
 <120> FAB Peguilaado para ABeta
 <130> X17087
 <150> US 60/885439
 <151> 2007-01-18
 15 <160> 14
 <170> PatentIn versão 3.4
 <210> 1
 <211> 112
 <212> PRT
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Construção sintética
 <400> 1
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 25 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
 30 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
5	100					105					110					
	<210>	2														
	<211>	112														
	<212>	PRT														
	<213>	Artificial														
10	<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				
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
20	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					
25	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														
30	<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
 5 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
 10 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
 15 100 105 110
 <210> 4
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 4
 His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
 1 5 10 15
 <210> 5
 <211> 15
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
 1 5 10 15
 30 <210> 6
 <211> 16
 <212> PRT

<213> Artificial
 <220>
 <223> Construção sintética
 <400> 6
 5 Ser Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His
 1 5 10 15
 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Construção sintética
 <400> 7
 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 15 1 5
 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Construção sintética
 <400> 8
 Thr Gln Ser Thr His Ser Pro Trp Thr
 1 5
 25 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Construção sintética
 <400> 9
 Gly Tyr Thr Phe Ser Arg Tyr Ser Met Ser

	1	5	10
	<210>	10	
	<211>	16	
	<212>	PRT	
5	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Construção sintética	
	<400>	10	
	Gln Ile Asn Ile Arg Gly Cys Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys		
10	1	5	10 15
	<210>	11	
	<211>	17	
	<212>	PRT	
	<213>	Artificial	
15	<220>		
	<223>	Construção sintética	
	<400>	11	
	Gln Ile Asn Ile Arg Gly Asn Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys		
	1	5	10 15
20	Gly		
	<210>	12	
	<211>	3	
	<212>	PRT	
	<213>	Artificial	
25	<220>		
	<223>	Construção sintética	
	<400>	12	
	Gly Asp Phe		
	1		
30	<210>	13	
	<211>	657	
	<212>	DNA	

<213> Artificial

<220>

<223> Construção sintética

<400> 13

5 gacatcggtta tgactcagac tccattgtcc ttgtctgtta ctccagggtca accagcttct 60
 atttcctggt cctcctccca atctttgatc tactccgacg gtaacggtta cttgcactgg 120
 tacttgcaaa agcctggtca atccccacaa ttgttgatct acaagggttc caacagattc 180
 tctggtgttc ctgacagatt ttctggttcc ggttccggtta ctgacttcac tttgaagatc 240
 tccagagttg aagctgagga tgttggtgtt tactactgta ctgagtccac tcattcccca 300
 10 tggacttttg gtggtgttac taagggtgag atcaagagaa ctggtgctgc tccatccgtt 360
 ttcattttcc caccatccga cgaacaattg aagtctggtta ctgcttccgt tgtttgtttg 420
 ttgaacaact tctaccaag agaggctaag gttcagtggg aggttgacaa cgctttgcaa 480
 tccggttaact cccaagaatc cgttactgag caagactcta aggactccac ttactccttg 540
 tcctccactt tgactttgtc caaggctgat tacgagaagc acaagggtta cgcttgtag 600
 15 gttacacatc agggtttgtc ctccccagtt actaagtcct tcaacagagg agagtcc 657

<210> 14

<211> 657

<212> DNA

<213> Artificial

20 <220>

<223> Construção sintética

<400> 14

gagggttcagt tgggtgaatc tgggtggtgga ttggttaagc ctggtggttc tttgagattg 60
 tcctgtgctg cttccggtta cactttctcc agatactcca tgtcctgggt tagacaagct 120
 25 ccaggaaagg gattggagtg ggttggtcaa atcaacatca gagggtgtaa cacttactac 180
 ccagacactg ttaagggaag attcactatc tccagagatg actccaagaa cactttgtac 240
 ttgcagatga actccttgaa aactgaggac actgctgttt actactgtac tactggtgac 300
 ttttggggac aggggaacttt ggttactgtt tcctccgctt ctactaaggg accatccgtt 360
 tttccattgg ctccatcctc taagtctact tccggtggtta ctgctgcttt gggatgtttg 420
 30 gttaaggact acttcccaga gccagttact gtttcttgga actccggtgc tttgacttct 480
 ggtgttcaca ctttcccagc tgttttgcaa tcttccggtt tgtactcctt gtcctccgtt 540
 gttactgttc catcctcttc cttgggtact cagacttaca tctgtaacgt taaccacaag 600
 ccatccaaca ctaagggtga caagaagggt gaaccaaagt cctctgacaa gactcac 657

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula compreendendo um fragmento de anticorpo que se liga especificamente ao peptídeo A β humano entre as posições de aminoácido 13-28, em que o dito fragmento de anticorpo é covalentemente ligado a uma molécula de polietileno glicol.

2. Molécula de acordo com a reivindicação 1, em que o fragmento de anticorpo é um fragmento Fab.

3. Molécula de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o fragmento de anticorpo compreende uma região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 1 e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 2.

4. Molécula de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, em que a molécula de polietileno glicol é covalentemente ligada à região variável de cadeia pesada do fragmento de anticorpo.

5. Molécula de acordo com a reivindicação 4, em que a molécula de polietileno glicol é covalentemente ligada a uma CDR da região variável de cadeia pesada do fragmento de anticorpo.

6. Molécula de acordo com qualquer uma das reivindicações 3-5, em que a molécula de polietileno glicol é covalentemente ligada à cisteína na posição de aminoácido 56 da região variável de cadeia pesada da dita SEQ ID NO: 2.

7. Molécula de acordo com a reivindicação 1 ou 2 compreendendo uma região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 1 e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 3.

8. Molécula de acordo com a reivindicação 7, em que a molécula de polietileno glicol é covalentemente ligada à região de dobradiça do fragmento de anticorpo.

9. Molécula de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, em que a molécula de polietileno glicol tem um peso molecular de cerca de 0,5 kD a cerca de 30 kD.

10. Molécula de acordo com a reivindicação 9, em que a molécula de polietileno glicol tem um peso molecular de cerca de 20 kD.

11. Molécula que consiste em um fragmento de anticorpo que

especificamente liga-se ao peptídeo A β humano entre as posições de aminoácido 13-28, em que o dito fragmento de anticorpo é covalentemente ligado a uma molécula de polietileno glicol.

5 12. Molécula compreendendo um fragmento de anticorpo com uma região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 1 e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 2, em que o dito fragmento de anticorpo é covalentemente ligado a uma molécula de polietileno glicol de 20 kD na posição 56 da região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 2.

10 13. Composição compreendendo a molécula como definida em qualquer uma das reivindicações 1-12.

14. Composição de acordo com a reivindicação 13 adicionalmente compreendendo um veículo farmaceuticamente aceitável.

15 15. Método de tratar ou prevenir uma condição associada com atividade do peptídeo A β , compreendendo administrar a um sujeito humano em necessidade do mesmo uma quantidade eficaz de uma molécula como definida em qualquer uma das reivindicações 1-12.

20 16. Método de tratar uma condição selecionada de um grupo que consiste na doença de Alzheimer clínica ou pré-clínica, síndrome de Down, ou angiopatia amilóide clínica ou pré-clínica (CAA), déficit cognitivo, acidente vascular cerebral, hemorragia cerebral, e debilitação mental geral, compreendendo administrar ao sujeito humano uma quantidade eficaz de uma molécula como definida em qualquer uma das reivindicações 1-12.

17. Molécula de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12, para o uso como um medicamento.

25 18. Uso de uma molécula como definida em qualquer uma das reivindicações 1-12 na preparação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de uma condição associado à atividade do peptídeo A β .

30 19. Uso de uma molécula como definida em qualquer uma das reivindicações 1-12 na preparação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de uma condição selecionada de um grupo que consiste na doença de Alzheimer clínica ou pré-clínica, síndrome de Down, angiopatia amilóide clínica ou pré-clínica (CAA), déficit cognitivo, acidente vascular cerebral, hemorragia cerebral, e debilitação mental geral.

RESUMO

Patente de Invenção: **"FAB PEGUILADO PARA ABETA"**.

A presente invenção refere-se a um método para tratar condições associadas à atividade do peptídeo A β profilática e terapeuticamente é
 5 descrito. O método emprega fragmentos de anticorpo humanizados que especificamente se ligam ao peptídeo A β humano entre as posições de aminoácido 13-28, em que os fragmentos de anticorpo são covalentemente ligados a uma molécula de polietileno glicol (PEG).

Novo quadro reivindicatório (total de 13 reivindicações) para processamento na Fase Nacional Brasileira.

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula compreendendo um fragmento de anticorpo que especificamente se liga ao peptídeo A β humano entre as posições de aminoácido 13-28, em que o fragmento de anticorpo compreende uma região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 1 e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 2, e em que uma molécula de polietileno glicol é covalentemente ligada a uma CDR da região variável de cadeia pesada do fragmento de anticorpo.

2. Molécula de acordo com a reivindicação 1, em que o fragmento de anticorpo é um fragmento Fab.

3. Molécula de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, em que a molécula de polietileno glicol é covalentemente ligada à cisteína na posição de aminoácido 56 da região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 2.

4. Molécula de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, em que a molécula de polietileno glicol tem um peso molecular de cerca de 0,5 kD a cerca de 30 kD.

5. Molécula de acordo com a reivindicação 4, em que a molécula de polietileno glicol tem um peso molecular de cerca de 20 kD.

6. Molécula compreendendo um fragmento Fab de anticorpo com uma região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 1 e uma região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 2, em que o dito fragmento Fab de anticorpo é covalentemente ligado a uma molécula de polietileno glicol de 20 kD na posição 56 da SEQ ID NO: 2.

7. Composição compreendendo a molécula como definida em qualquer uma das reivindicações 1-6.

8. Composição de acordo com a reivindicação 7, adicionalmente compreendendo um veículo farmacologicamente aceitável.

9. Molécula de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6 para o uso como um medicamento.

10. Uso de uma molécula como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 6 na preparação de um medicamento para o tratamento

ou prevenção de uma condição associada com atividade do peptídeo A β .

11. Uso de uma molécula como definida em qualquer uma das reivindicações 1-6 na preparação de um medicamento para o tratamento ou prevenção de uma condição selecionada de um grupo que consiste na doença de Alzheimer, síndrome de Down, angiopatia amilóide cerebral (CAA), déficit cognitivo, acidente vascular cerebral, hemorragia cerebral, e debilitação mental geral.

12. Uso de uma molécula de acordo com a reivindicação 11, em que a doença de Alzheimer é doença de Alzheimer pré-clínica.

10 13. Uso de uma molécula de acordo com a reivindicação 11, em que a doença de Alzheimer é doença de Alzheimer clínica.