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

(21) **PI0619357-9 A2**

BRPI0619357A2

(22) Data de Depósito: 30/11/2006
(43) Data da Publicação: 27/09/2011
(RPI 2125)

(51) Int.Cl.:
C07K 16/18
A61K 39/395
G01N 33/53
G01N 33/577
C12N 15/13
C12N 5/18
A61P 25/28

(54) Título: ANTICORPOS MONOCLONAIS E USOS DOS MESMOS

(30) Prioridade Unionista: 30/11/2005 US 60/740.866, 03/03/2006 US 60/778.950, 03/03/2006 US 60/778.950, 30/11/2005 US 60/740.866

(73) Titular(es): Abbott GMBH & CO KG., Abbott Laboratoires

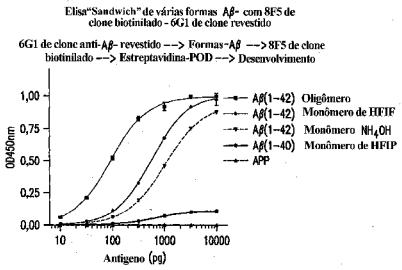
(72) Inventor(es): Andreas R. Striebinger, Boris Labkvosky, Heinz Hillen, Patrick Keller, Stefan Barghorn, Ulrich Ebert

(74) Procurador(es): NELLIE ANNE DANIEL SHORES

(86) Pedido Internacional: PCT US2006046148 de 30/11/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/064972de 07/06/2007

(57) Resumo: ANTICORPOS MONOCLONAIS E USOS DOS MESMOS A presente invenção se refere aos anticorpos mono- clonais (por exemplo, 8F5 e 8C5) que podem ser empregados, por exemplo, na prevenção, tratamento e diagnóstico da Doença de Alzheimer ou outros transtornos neurodegenerativos.



	Aβ(1-42)Oligômero	Aβ(1-42) Monômero HFIP	Aβ(1-42) Monômero NH_4OH	Aβ(1-40) Monômero HFIP
BASE	-0,001218	0,004304	0,006727	0,004288
TOPO	0,9926	1,002	0,9292	0,1116
LOGEC50	1,958	2,745	3,003	2,825
PONTO DE INFLEXÃO	1,215	1,270	1,204	1,375
EC50	90,74	555,8	1007	667,8

PI - 0619354-9
Pct - 0200200935 4-9
Data - 03/04/08

"ANTICORPOS MONOCLONAIS E USOS DOS MESMOS"

Campo Técnico

A presente invenção se refere aos anticorpos monoclonais (por exemplo, 8F5 e 8C5) que podem ser empregados, por exemplo, na prevenção, tratamento e diagnóstico da doença de Alzheimer ou outros transtornos neurodegenerativos.

Antecedentes

A doença de Alzheimer (AD) é um transtorno neurodegenerativo caracterizado por uma perda progressiva das capacidades cognitivas e pelos aspectos neuropatológicos característicos compreendendo depósitos de amilóides, emaranhados neurofibrilares e perda neuronal em várias regiões do cérebro, vide Hardy e Selkoe (Science 297, 353 (2002); Mattson (Nature 431, 7004 (2004). Os principais constituintes dos depósitos de amilóide são os peptídeos amilóide beta (Aβ), com o tipo de 42 aminoácidos de comprimento (Aβ1-42) sendo o mais proeminente.

Especificamente, a proteína amilóide β(1-42) é um polipeptídeo possuindo 42 aminoácidos que é derivada da proteína precursora amilóide (APP) por processamento proteolítico. Isso também inclui, além das variantes humanas, isoformas da proteína amilóide β (1-42) presentes nos organismos diferentes dos humanos, especificamente outros mamíferos, especialmente ratos. Essa proteína, que tende a polimerizar em um ambiente aquoso, pode estar presente em formas moleculares muito diferentes.

Uma correlação simples da deposição de proteína insolúvel com a ocorrência ou progressão dos transtornos de

demência tais como, por exemplo, doença de Alzheimer, provou não ser convincente (Terry e outros, Ann. Neurol. 30, 572-580 (1991); Dickson e outros, Neurobiol. Aging 16, 285-298 (1995)). Em contraste, a perda da sinápse e percepção cognitiva parece se correlacionar melhor com as formas solúveis de Aβ (1-42) (Lue e outros, Am. J. Pathol. 155, 853-862 (1999); McLean e outros, Ann. Neurol. 46, 860-866 (1999)).

Embora anticorpos policlonais e monoclonais tenham surgido no passado contra Aβ (1-42), nenhum provou produzir o efeito terapêutico desejado sem também causar sérios efeitos colaterais em animais e/ou seres humanos. Por exemplo, resultados de imunização passiva dos estudos pré-clínicos em camundongos APP23 muito velhos que receberam anticorpo anti-Aβ (1-42) direcionados ao término N, uma vez por semana, por 5 meses, indicaram efeito colateral terapeuticamente relevante. Especificamente, esses camundongos mostraram um aumento no número e gravidade de micro-hemorragias em comparação aos camundongos tratados com salmoura (Pfeifer e outros, Science 2002 298:1379). Um aumento semelhante na hemorragia foi recentemente também descrito para camundongos Tg2576 e PDAPP muito velhos (> 24 meses) (Wilcock e outros, J Neuroscience 2003, 23: 3745-51; Racke e outros, J Neuroscience 2005, 25:629-636). Em ambas as cepas, a injeção de anti-Aβ (1-42) resultou em um aumento significativo das micro-hemorragias. Assim, existe uma enorme necessidade terapêutica para o desenvolvimento de substâncias biológicas que previnam ou tornem lenta a progressão da doença, sem induzir efeitos negativos e potencialmente letais no corpo humano.

Tal necessidade é especificamente evidente em vista do aumento da longevidade da população em geral e, com esse aumento, uma elevação associada ao número de pacientes diagnosticados anualmente com a doença de Alzheimer. Adicionalmente, tais anticorpos permitirão o diagnóstico apropriado da doença de Alzheimer em um paciente que experimenta os sintomas da mesma, um diagnóstico que pode ser apenas confirmado por autópsia atualmente. Adicionalmente, os anticorpos permitirão a elucidação das propriedades biológicas das proteínas e outros fatores biológicos responsáveis por essa doença debilitante.

Todas as patentes e publicações referidas aqui são incorporadas em sua totalidade, como referência.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção inclui um anticorpo isolado que se liga com especificidade maior a um globulômero da proteína amilóide beta (Aβ) em relação a um monômero da proteína amilóide beta. Assim, a ligação preferencial é observada. O anticorpo pode ser, por exemplo, um anticorpo monoclonal, tal como, 8F5 ou 8C5. A razão de especificidade de ligação ao globulômero versus monômero é de pelo menos 1,4. Especificamente, a razão é preferivelmente de pelo menos, cerca de 1,4 a pelo menos, cerca de 16,9. (Uma razão de 1,0-17,5 incluindo os pontos finais) é também considerada como estando dentro do escopo da presente invenção,, bem como as porcentagens decimas das mesmas. Por exemplo, 1,1, 1,2, 1,3, ..., 2,0, 2,1, 2,2, ..., 17,1, 17,2, 17,3, 17,4, 17,5, bem como todos os inteiros completos entre e as porcentagens dos

mesmos sendo considerados como estando dentro do escopo da presente invenção. O monômero da proteína amilóide beta pode ser, por exemplo, monômero Aβ (1-42) ou monômero Aβ (1-40).

Adicionalmente, a presente invenção também engloba um anticorpo monoclonal (referido aqui como "8F5") produzido por um hibridoma possuindo número de designação da American Type Culture Collection, PTA-7238, bem como o hibridoma que produz esse anticorpo monoclonal (isto é, 8F5). Também, a presente invenção inclui um anticorpo monoclonal (referido aqui como "8C5") produzido por um hibridoma possuindo número de designação da American Type Culture Collection, PTA-7407, bem como o hibridoma que produz esse anticorpo monoclonal (isto é, 8C5).

Adicionalmente, a presente invenção inclui um anticorpo monoclonal compreendendo uma cadeia pesada variável codificada pela SEQ ID NO:1. Esse anticorpo pode ser murino, humano ou humanizado.

Adicionalmente, a presente invenção inclui um anticorpo monoclonal compreendendo uma cadeia leve variável codificada pela SEQ ID NO:2. Esse anticorpo pode ser também murino, humano ou humanizado. O anticorpo pode compreender, adicionalmente, uma cadeia leve-pesada variável codificada pela SEQ ID NO:1 e pode ser humano ou humanizado.

Além disso, a presente invenção inclui um anticorpo monoclonal compreendendo a SEQ ID NO:3. O anticorpo pode ser murino, humano ou humanizado.

Adicionalmente, a presente invenção engloba um anticorpo monoclonal compreendendo a SEQ ID NO:4. Esse anti-

corpo pode ser murino, humano ou humanizado. Esse anticorpo pode compreender, adicionalmente, a SEQ ID NO:3 e pode ser murino, humano ou humanizado.

Adicionalmente, a presente invenção inclui um anticorpo monoclonal compreendendo uma cadeia pesada variável codificada pela SEQ ID NO:11. Esse anticorpo pode ser murino, humano ou humanizado.

Adicionalmente, a presente invenção inclui um anticorpo monoclonal compreendendo uma cadeia leve variável codificada pela SEQ ID NO:12. Esse anticorpo pode ser também murino, humano ou humanizado. O anticorpo pode compreender, adicionalmente, uma cadeia pesada variável codificada pela SEQ ID NO:11 e pode ser humano ou humanizado.

Além disso, a presente invenção inclui um anticorpo monoclonal compreendendo a SEQ ID NO:19. O anticorpo pode ser murino, humano ou humanizado.

Adicionalmente, a presente invenção engloba um anticorpo monoclonal compreendendo a SEQ ID NO:20, Esse anticorpo pode ser murino, humano ou humanizado. Esse anticorpo pode compreender, adicionalmente, a SEQ ID NO:19 e pode ser murino, humano ou humanizado.

A presente invenção também inclui um anticorpo isolado que se liga com especificidade maior a um globulômero de proteína amilóide beta em relação a uma fibrila de proteína amilóide beta. Esse anticorpo pode ser, por exemplo, monoclonal e pode ser o anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma possuindo número de designação da American Type Culture Collection, PTA-7243 ou o hibridoma possuindo o nú-

mero de designação da American Type Culture Collection, PTA-7407. O hibridomas que produzem esses anticorpos monoclonais também se encontram dentro do escopo da presente invenção.

Adicionalmente, a presente invenção inclui um anticorpo no qual pelo menos uma das regiões de determinação de complementaridade (CDRs) da cadeia pesada variável é selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 e SEQ ID NO:7.

Além disso, a presente invenção também inclui um anticorpo no qual pelo menos um das CDRs da cadeia leve variável é selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 e SEQ ID NO:10, Esse anticorpo pode compreender, adicionalmente, pelo menos uma CDR da cadeia pesada variável selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 e SEQ ID NO:7.

A presente invenção também inclui um anticorpo no qual pelo menos um das CDRs da cadeia pesada variável é selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14 e SEQ ID NO:15.

Adicionalmente, a presente invenção também engloba um anticorpo no qual pelo menos um das CDRs da cadeia leve variável é selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 e SEQ ID NO:18. Esse anticorpo pode compreender, adicionalmente, pelo menos uma CDR da cadeia pesada variável selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14 e SEQ ID NO:15.

Adicionalmente, a presente invenção engloba um método para tratar ou prevenir doença de Alzheimer em um paci-

ente que precise do tratamento ou prevenção. Esse método compreende administração ao paciente, de qualquer um ou mais dos anticorpos isolados descritos acima, em uma quantidade suficiente para efetuar o tratamento ou prevenção. O anticorpo isolado pode ser administrado, por exemplo, através de uma via selecionada do grupo consistindo em administração intramuscular, administração intravenosa e administração subcutânea.

A presente invenção também inclui um método para diagnosticar a doença de Alzheimer em um paciente com suspeita dessa doença. Esse método compreende as etapas de: 1) isolamento de uma amostra biológica do paciente; 2) contado da amostra biológica com pelo menos um dos anticorpos descritos acima por um tempo e sob condições suficientes para formação de complexos de antígeno/anticorpo; e 3) detecção da presença dos complexos de antígeno/anticorpo na amostra, presença dos complexos indicando um diagnóstico da doença de Alzheimer no paciente. O antígeno pode ser, por exemplo, um globulômero ou uma porção ou fragmento do mesmo que possui as mesmas propriedades funcionais do globulômero integral (por exemplo, atividade de ligação).

Adicionalmente, a presente invenção inclui outro método para diagnóstico da doença de Alzheimer em um paciente com suspeita dessa doença. Esse método compreende as etapas de: 1) isolamento de uma amostra biológica do paciente; 2) contado da amostra biológica com um antígeno por um tempo e sob condições suficientes para a formação de complexos de anticorpo/antígeno; 3) adição de um conjugado aos complexos

de anticorpo/antígeno resultantes por um tempo e sob condições suficientes de modo a permitir que o conjugado se una ao anticorpo ligado, onde o conjugado compreende um dos anticorpos descritos acima, anexado ao composto de geração de sinal capaz de gerar um sinal detectável; e 4) detecção da presença de um anticorpo que pode estar presente na amostra biológica, por detecção de um sinal gerado pelo composto de geração de sinal, o sinal indicando um diagnóstico da doença de Alzheimer no paciente. O antígeno pode ser um globulômero ou uma porção ou fragmento do mesmo possuindo as mesmas propriedades funcionais do globulômero integral (por exemplo, atividade de ligação).

A presente invenção inclui um método adicional para o diagnóstico da doença de Alzheimer em um paciente suspeito de sofrer de doença de Alzheimer. Esse método compreende as etapas de: 1) isolamento de uma amostra biológica do paciente; 2) contado da amostra biológica com anti-anticorpo, onde o anti-anticorpo é específico para um dos anticorpos descritos acima, por um tempo e sob condições suficientes para permitir a formação de complexos de anti-anticorpo/anticorpo, os complexos contendo anticorpo presente na amostra biológica; 2) adição de um conjugado aos complexos de anti-anticorpo/anticorpo resultantes, por um tempo e sob condições suficientes de modo a permitir que o conjugado se una ao anticorpo ligado, onde o conjugado compreende um antígeno, que se liga a um composto de geração de sinal capaz de gerar um sinal detectável; e 3) detecção de um sinal gerado pelo composto de geração de sinal, o sinal indi-

cando um diagnóstico da doença de Alzheimer no paciente.

Adicionalmente, a presente invenção inclui uma composição compreendendo um ou mais dos anticorpos descritos acima (por exemplo, 8F5 e 8C5).

A presente invenção inclui outro método para prevenir ou tratar doença de Alzheimer em um paciente que precise de tal prevenção ou tratamento. Esse método compreende a etapa de administração ao paciente, da composição descrita imediatamente acima, em uma quantidade suficiente para efetuar a prevenção ou tratamento.

Adicionalmente, a presente invenção engloba uma vacina compreendendo pelo menos um dos anticorpos descritos acima e um adjuvante farmaceuticamente aceitável.

Além disso, a presente invenção inclui um método adicional para prevenir ou tratar doença de Alzheimer em um paciente que precise de tal prevenção ou tratamento. Esse método compreende a etapa de administração ao paciente da vacina citada acima, em uma quantidade suficiente para efetuar a prevenção ou tratamento.

Adicionalmente, a presente invenção engloba um método para identificação de compostos apropriados a imunização ativa de um paciente com previsão de desenvolver doença de Alzheimer. Esse método compreende: 1) exposição de um ou mais compostos de interesse a um ou mais dos anticorpos descritos acima por um tempo e sob condições suficientes para que um ou mais compostos se liguem ao anticorpo ou anticorpos; 2) identificação daqueles compostos que se ligam ao anticorpo ou anticorpos, os compostos identificados a serem

usados na imunização ativa em um paciente com previsão de desenvolver doença de Alzheimer.

Também, a presente invenção inclui um kit compreendendo: a) pelo menos um dos anticorpos isolados descritos acima e b) um conjugado compreendendo um anticorpo anexado a um composto de geração de sinal, onde o anticorpo do conjugado é diferente do anticorpo isolado. O kit pode incluir também uma inserção de embalagem com instruções de como os componentes do kit devem ser utilizados.

A presente invenção também engloba um kit compreendendo: a) um anti-anticorpo para um dos anticorpos descritos acima e b) um conjugado compreendendo um antígeno anexado a um composto de geração de sinal. O antígeno pode ser um globulômero ou um fragmento ou porção do mesmo possuindo as mesmas características funcionais do globulômero (por exemplo, atividade de ligação). Novamente, o kit pode incluir também uma inserção de embalagem com instruções de como os componentes do kit devem ser utilizados.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 ilustra a seletividade de 8F5 para globulômeros versus monômeros Aβ(1-42), Aβ(1-40) e sAPP. Os fatores de seletividade para 8F5 podem ser calculados como taxas entre Valores de EC50 (versus monômero Aβ(1-42) em HFIP: 555,8/90,74 = 6,1; versus monômero Aβ(1-42) em NH_4OH: 1007/90,74 = 11,1; versus monômero Aβ(1-40): 667,8/90,74 = 7,4 versus sAPP: >100)

A Figura 2 ilustra análise SDS-PAGE de anticorpos de cadeia leve e pesada ligados a fibrila (lanes 4, 6, 8) e

frações livres não ligadas correspondentes (lanes 3, 5, 7) nos sobrenadantes.

A Figura 3 ilustra o teor de Aβ42 e Aβ40 nas amostras CSF de pacientes com Comprometimento Cognitivo Brando (MCI, esquerda) ou doença de Alzheimer (AD, direita). Em ambos os grupos, pode ser observado que 8F5 alcança uma proporção mais alta de Aβ(1-42) e menos ou uma quantidade igual de Aβ(1-40), se comparado ao anticorpo padrão 6E10 ou comparado à análise de amostra direta com os mesmos ELISAs.

A Figura 4 ilustra um novo índice de reconhecimento do objeto como o tempo decorrido com objeto desconhecido versus familiar nos três grupos de camundongos transgênicos APP (isto é, 6G1, 8F5, PBS) e um grupo de ninhadas não transgênicas (tipo selvagem). Os animais (número dado abaixo das colunas) foram imunizados com anticorpos monoclonais 6G1 ou 8F5 ou tratados com veículo (isto é, salmoura tamponada com fosfato; PBS e tipo selvagem) por injeção intraperitoneal uma vez por semana por três semanas. No dia da última injeção, foi realizada uma nova tarefa de reconhecimento do objeto. A diferença entre os grupos do tipo PBS e selvagem indicou um déficit cognitivo dos camundongos transgênicos APP nesse paradigma. Os camundongos que receberam injeção de PBS tiveram desempenho em nível de chance (isto é, não significativamente diferente de 50), enquanto todos os outros camundongos mostraram reconhecimento do objeto mostrado (teste t-, estrelas). Quando o desempenho dos camundongos APP tratados com anticorpo foi comparado aos grupos de controle, foi observada uma diferença significativa versus ca-

mundongos tratados com PBS porém não versus camundongos do tipo selvagem (ANOVA com teste-t pós-hoc; círculos) indicando que o tratamento com anticorpo reverteu o déficit cognitivo nesses camundongos transgênicos APP.

A Figura 5(A) ilustra a seqüência de DNA (SEQ ID NO:1) da cadeia pesada variável codificando o anticorpo monoclonal referido aqui como "8F5" e a figura 5 (B) ilustra a seqüência de DNA (SEQ ID NO:2) da cadeia leve variável codificando o anticorpo monoclonal 8F5. (Regiões de determinação de complementaridade (CDRs) são sublinhadas em cada seqüência; vide também a figura 6.)

A Figura 6 (A) ilustra a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:3) da cadeia pesada variável do anticorpo monoclonal 8F5 e a figura 6 (B) ilustra a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:4) da cadeia leve variável do anticorpo monoclonal 8F5. Uma CDR da cadeia pesada variável é representada pela seqüência de aminoácido SYGMS (SEQ ID NO:5). Outra CDR da cadeia pesada variável é representada pela seqüência de aminoácido ASINSNGGSTYYPDSVKG (SEQ ID NO:6) e outra CDR da cadeia pesada variável é representada pela seqüência de aminoácido SGDY (SEQ ID NO:7). Uma CDR da cadeia leve variável é representada pela seqüência de aminoácido RSSQSLVYSNGDTYLH (SEQ ID NO:8). Outra CDR da cadeia leve variável é representada pela seqüência de aminoácido KVSNRFS (SEQ ID NO:9) e outra CDR da cadeia leve variável é representada pela seqüência de aminoácido SQSTHVPWT (SEQ ID NO:10). Todas as CDRs descritas acima estão sublinhadas nas figuras 6 (A) e 6 (B).

A Figura 7 mostra a ligação dos anticorpos em diferentes concentrações, em relação às seções transversais dos neocórtices dos pacientes sofrendo da doença de Alzheimer (AD) ou camundongos transgênicos APP velhos. Especificamente, a figura 7 (A) ilustra a verificação dos depósitos de amilóide por coloração Vermelho Congo como placas no tecido cerebral e como angiopatia amilóide cerebral (CAA) nos vasos cerebrais na linhagem de camundongo transgênico APP Tg2576 e em um paciente AD (RZ55). A figura 7 (B) ilustra que a coloração dos depósitos parenquimais de Aβ (placas amilóides) em um paciente AD (RZ16) ocorre apenas com 6G1 e o anticorpo comercialmente disponível 6E10, enquanto 8F5 e 8C5 mostram coloração consideravelmente mais fraca. A figura 7 (C) mostra que a coloração forte dos depósitos parenquimais de Aβ (placas amilóides) em camundongos TG2576 ocorre apenas com 6G1 e o anticorpo comercialmente disponível 6E10, enquanto 8F% e 8C5 mostram coloração consideravelmente mais fraca. As figuras 7 (D)-(G) ilustram a quantificação da análise da coloração da placa Aβ nas imagens histológicas empregando análise de imagem. Os valores de densidade óptica (0% = nenhuma coloração) foram calculados de valores em escala cinza de placas subtraídos dos valores em escala cinza do tecido subjacente. (Fig. (D) = ligação de 0,7 μg/mL de anticorpo no camundongo Tg2576; Fig. (E)= ligação de 0,07-0,7 μg/mL de anticorpo no camundongo APP/L; Fig. (F)= ligação de 0,7 μg/mL de anticorpo em um paciente AD (RZ55); e Fig. (G)= ligação de 0,07-0,7 μg/mL de anticorpo em um paciente AD (RZ16)). As diferenças entre a coloração dos anticorpos dis-

poníveis comercialmente 6E10 (estrelas) e 4G8 (círculos) e anticorpos 6G1, 8C5 e 8F5 (um asterisco/círculo: $p < 0,05$, dois asteriscos/círculos: $p < 0,01$ e três asteriscos/círculos: $p < 0,001$ versus controle; teste-t de Bonferroni pós-hoc após ANOVA com $p < 0,001$) foram estatisticamente avaliadas (figura (D) e fig. (E)). Nas figuras (E) e (G), os anticorpos 8C5 e 8F5 mostraram sempre coloração menos significativa em relação aos anticorpos 6E10 e 4GO disponíveis comercialmente ($p < 0,05$ no teste-t pós-hoc após $p < 0,001$ em ANOVA). A figura (H) ilustra que a coloração mais forte dos depósitos vasculares de Aβ (setas) ocorre apenas com 6G1 e o anticorpo 6E10 disponível comercialmente, enquanto a coloração com 8F5 ou 8C5 foi mais fraca. Uma situação qualitativamente semelhante foi encontrada no camundongo Tg2576 (não mostrado aqui).

A Figura 8 ilustra a seletividade de 8C5 para globulômeros versus monômeros Aβ(1-42), Aβ(1-40) e sAPP. Os fatores de seletividade para 8C5 podem ser calculados como taxas entre valores de EC50 (versus monômero Aβ (1-42) em HFIP: 2346/568,2 = 4,1; versus monômero Aβ(1-42) em NH_4OH: >100; versus monômero Aβ(1-40): >100; versus sAPP : >100)

A Figura 9 (A) ilustra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO:11) codificando a cadeia pesada de 8C5 e a figura 9 (B) ilustra a seqüência de nucleotídeo (SEQ ID NO:12) codificando a cadeia leve de 8C5. As seqüências de nucleotídeos codificando as CDRs correspondentes, observadas nas figuras 10 (A) e 10 (B), são sublinhadas.

A Figura 10 (B) ilustra a seqüência de aminoácido

(SEQ ID NO:19) da cadeia pesada variável de anticorpo monoclonal 8C5, e a figura 10 (B) ilustra a seqüência de aminoácido (SEQ ID NO:20) da cadeia leve variável do anticorpo monoclonal 8F5. Uma CDR da cadeia pesada variável é representada pela seqüência de aminoácido SYGMS (SEQ ID NO:13). Outra CDR da cadeia pesada variável é representada pela seqüência de aminoácido SIKNNGGSTYYPDSLKG (SEQ ID NO:14), e outra CDR da cadeia pesada variável é representada pela seqüência de aminoácido SGDY (SEQ ID NO:15). Uma CDR da cadeia leve variável é representada pela seqüência de aminoácido RSSQSLVHSNGDTFLH (SEQ ID NO:16). Outra CDR da cadeia leve variável é representada pela seqüência de aminoácido KVSNRFS (SEQ ID NO:17), e outra CDR da cadeia leve variável é representada pela seqüência de aminoácido SQSIHVPWT (SEQ ID NO:18). Todas as CDRs descritas acima são sublinhadas nas figuras 10(A) e 10(B).

DESCRIÇÃO DETALAHDA DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere a um anticorpo monoclonal, referido aqui como "8F5", bem como outros anticorpos correlatos (por exemplo, 8C5). Esses anticorpos podem ser usados, por exemplo, no diagnóstico, prevenção e tratamento da doença de Alzheimer e outros transtornos neurodegenerativos.

O anticorpo monoclonal 8F5, bem como o anticorpo monoclonal 8C5 possuem muitas propriedades interessantes que permitem aos mesmos serem candidatos terapêuticos extremamente interessantes, bem como, candidatos a diagnóstico extremamente úteis. Por exemplo, os anticorpos monoclonais 8F5

e 8C5 possuem ligação preferencial aos globulômeros Aβ(1-42) quando comparados aos monômeros ou fibrilas.

O termo "Aβ(X-Y)" aqui se refere à seqüência de aminoácido da posição X do aminoácido para a posição Y da proteína amilóide β humana incluindo ambas X e Y e, especificamente, se refere à seqüência de aminoácido da posição X do aminoácido para posição Y do aminoácido de uma seqüência de aminoácido DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGGW IA ou qualquer uma de suas variantes ocorrendo naturalmente, especificamente aquelas com pelo menos uma mutação selecionada do grupo consistindo em A2T, H6R, D7N, A21G ("Flemish"), E22G ("Arctic"), E22Q ("Dutch"), E22K ("Italian"), D23N ("Iowa"), A42T e A42V onde os números são relativos à posição de partida do peptídeo Aβ, incluindo ambas posição X e Y ou uma seqüência coma té três substituições de aminoácido adicionais, nenhuma das quais podendo impedir a formação do globulômero. Uma substituição de aminoácido "adicional" é definida aqui como qualquer desvio da seqüência canônica que não é encontrada na natureza.

Mais especificamente, o termo "Aβ (1-42)" aqui se refere à seqüência de aminoácido da posição 1 do aminoácido à posição 42 do aminoácido da proteína amilóide β humana incluindo ambas 1 e 42 e, especificamente, se refere à seqüência de aminoácido da posição 1 do aminoácido à posição 42 do aminoácido da seqüência de aminoácido DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGGW IA (correspondendo às posições 1 a 42 dos aminoácidos) ou qualquer uma de suas variantes ocorrendo naturalmente. Tais variantes podem ser, por exemplo, aquelas

com pelo menos uma mutação selecionada do grupo consistindo em A2T, H6R, D7N, A21G ("Flemish"), E22G ("Arctic"), E22Q ("Dutch"), E22K ("Italian"), D23N ("Iowa"), A42T e A42V onde os números são relativos ao início do peptídeo Aβ, incluindo ambos 1 e 42 ou uma seqüência com até três substituições de aminoácido adicionais, nenhuma das quais podendo impedir a formação do globulômero. Da mesma forma, ao termo "Aβ (1-40)" aqui se refere à seqüência de aminoácido da posição 1 do aminoácido à posição 40 do aminoácido da proteína amilóide β humana incluindo ambos 1 e 40 e se refere, especificamente, à seqüência de aminoácido da posição 1 do aminoácido à posição 40 do aminoácido da seqüência de aminoácido DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGGW ou qualquer uma de suas variantes ocorrendo naturalmente. Tais variantes incluem, por exemplo, aquelas com pelo menos um mutação selecionada do grupo consistindo em A2T, H6R, D7N, A21G ("Flemish"), E22G ("Arctic"), E22Q ("Dutch"), E22K ("Italian") e D23N ("Iowa") onde os números são relativos à posição inicial do peptídeo Aβ, incluindo ambos 1 e 40 ou uma seqüência com até três substituições de aminoácido adicionais, nenhuma das quais podendo impedir a formação do globulômero.

O termo "globulômero Aβ(X-Y)" (também conhecido como "oligômero globular Aβ(X-Y)") aqui se refere à associação solúvel, globular, não covalente dos peptídeos A β (X-Y), conforme definido acima, possuindo homogeneidade e características físicas distintas. Os globulômeros Aβ(X-Y) são conjuntos oligoméricos estáveis, não fibrilares de peptídeos A β(X-Y) que são obtidos por incubação com detergentes aniô-

nicos. Em contraste ao monômero e fibrilas, esses globulômeros são caracterizados por números de conjunto definidos de subunidades (por exemplo, formas agrupadas anteriormente, n=3-6, oligômeros A", e formas agrupadas posteriormente n=12-14", oligômeros B", conforme descrito na Publicação de Pedido Internacional PCT número WO 04/067561). Os globulômeros possuem uma estrutura do tipo globular tridimensional ("glóbulo fundido", vide Barghorn e outros, 2005, J. Neurochem, 95, 834-847). Eles podem ser adicionalmente caracterizados por um ou mais dos seguintes aspectos:

- capacidade de clivagem dos aminoácidos N-terminal X-23 em relação às proteases indiscriminadas (tais como termolisina ou endoproteinase GLuC) rendendo formas truncadas dos globulômeros Aβ(X-Y);

- não acessibilidade dos aminoácidos C-terminal 24Y com as proteases promíscuas e anticorpos; e

- formas truncadas desses globulômeros mantêm a estrutura de núcleo tridimensional dos globulômeros com uma acessibilidade melhor do epítopo do núcleo Aβ(20-Y) em sua conformação do globulômero.

De acordo com a invenção e, especificamente, com a finalidade de avaliar as afinidades de ligação dos anticorpos da presente invenção, o termo "globulômero Aβ(X-Y)" aqui se refere a um produto que é obtido por um processo conforme descrito na Publicação de Pedido Internacional número WO 04/067561, que é incorporada aqui em sua totalidade como referência. O processo compreende desdobramento de um peptídeo Aβ(X-Y) natural, recombinante ou sintético ou um derivado do

mesmo; exposição do peptídeo Aβ(X-Y) parcialmente desdobrado ou derivado do mesmo a um detergente, redução da ação do detergente e continuidade da incubação.

Para a finalidade de desdobramento do peptídeo, agentes de ruptura de ligação de hidrogênio, tais como, por exemplo, hexafluorisopropanol (HFIP) podem atuar na proteína. Os tempo de ação de alguns minutos, por exemplo cerca de 10 a 60 minutos, são suficientes quando a temperatura de ação é de cerca de 20 a 50°C e, especificamente, cerca de 35 a 40°C. Dissolução subsequente do resíduo evaporado à secura, preferivelmente na forma concentrada, nos solventes orgânicos apropriados miscíveis com tampões aquosos, tais como, por exemplo, sulfóxido de dimetila (DMSO), resulta em uma suspensão do peptídeo pelo menos parcialmente desdobrado ou derivado do mesmo, que pode ser usada subseqüentemente. Caso necessário, a suspensão de estoque pode ser armazenada em temperatura baixa, por exemplo, cerca de -20°C por um período nesse ínterim.

Alternativamente, o peptídeo ou derivado do mesmo pode ser absorvido em solução ligeiramente ácida, preferivelmente aquosa, por exemplo, uma solução aquosa de cerca de 10 mM HCl. Após um tempo de incubação de cerca de alguns minutos, os componentes insolúveis são removidos por centrifugação. Alguns minutos a 10.000 g são recomendáveis. Essas etapas do método são preferivelmente realizadas a temperatura ambiente, isto é, uma temperatura na faixa de cerca de 20 a 30°C. O sobrenadante obtido após centrifugação contém o peptídeo Aβ (X-Y) ou um derivado do mesmo e pode ser armaze-

nado a baixa temperatura, por exemplo, a cerca de -20°C por um período nesse ínterim.

A exposição que se segue a um detergente se refere à oligomerização do peptídeo ou do derivado do mesmo para fornecer o tipo intermediário de oligômeros (na Publicação de Pedido Internacional número WO 04/067561 referido como oligômeros A). Para essa finalidade, um detergente pode agir opcionalmente, pelo menos sobre um peptídeo parcialmente desdobrado ou derivado do mesmo, até oligômero intermediário suficiente ser produzido. É dada preferência ao emprego de detergentes iônicos, especificamente detergentes aniônicos.

De acordo com uma modalidade específica, um detergente da fórmula (I):

R-X

é empregado, onde o radical "R" é uma alquila ramificada ou não ramificada possuindo 6 a 20 e preferivelmente 10 a 14 átomos de carbono ou alquenila ramificada ou não ramificada possuindo de 6 a 20 átomos de carbono e preferivelmente 10 a 14 átomos de carbono e o radical "X! é um grupo ácido ou sal do mesmo com X sendo preferivelmente selecionado dentre -COMO-M^+, SO_3-M^+ e é, mais preferivelmente, -OS_3-M^+ e M^+ é um cátion de hidrogênio ou um cátion inorgânico ou orgânico preferivelmente selecionado dos cátions de metal alcalino, cátions de metal alcalino terroso e cátions de amônio. São mais vantajosos os detergentes da fórmula (I) nos quais R é uma alquila não ramificada da qual os radicais alq-1-ila devem ser mencionados, especificamente. É dada preferência específica ao dodecil sulfato de sódio (SD). Á-

cido láurico e ácido oléico podem também ser empregados com vantagem. O sal de sódio do detergente lauroilsarcosina (também conhecido como sarcosila NL-30 ou Gardol(R)) é também especificamente vantajoso.

O tempo de ação do detergente, especificamente, depende se ou não e em caso positivo, em qual extensão o peptídeo ou derivado do mesmo submetido a oligomerização sofreu desdobramento. Se, de acordo com a etapa de desdobramento, o peptídeo ou derivado do mesmo tiver sido tratado antecipadamente com um agente de ruptura de ligação de hidrogênio (isto é, especificamente com hexafluorisopropanol), os tempos de ação na faixa de algumas horas, vantajosamente de cerca de 1 a 20 e, especificamente de cerca de 2 a 10 horas, são suficientes quando a temperatura de ação é de cerca de 20 a 50°C e, especificamente, de cerca de 35 a 40°C. Se um peptídeo menos desdobrado ou essencialmente não desdobrado ou derivado do mesmo for o ponto de partida, tempos de ação correspondentemente mais longos serão melhores. Se o peptídeo ou derivado do mesmo tiver sido pré-tratado, por exemplo, de acordo com o procedimento indicado acima como uma alternativa para o tratamento HFIP ou o peptídeo ou derivado do mesmo for submetido diretamente à oligomerização, tempos de ação na faixa de cerca de 5 a 30 horas e, especificamente de cerca de 10 a 20 horas serão suficientes quando a temperatura de ação for de cerca de 20 a 50°C e, especificamente de cerca de 35 a 40°C. Após incubação, os componentes insolúveis serão vantajosamente removidos por centrifugação. Alguns minutos a 10.000 g serão suficientes.

A concentração do detergente a ser escolhida depende do detergente usado. Se SDS for empregado, uma concentração na faixa de 0,01 a 1% em peso, preferivelmente de 0,05 a 0,5% em peso, por exemplo, de cerca de 0,2% em peso será suficiente. Se for empregado ácido láurico ou ácido oléico, concentrações um pouco maiores serão apropriadas, por exemplo na faixa de 0,05 a 2% em peso, preferivelmente de 0,1 a 0,5% em peso, por exemplo, de cerca de 0,5% em peso. A ação do detergente terá lugar em uma concentração de sal aproximadamente na faixa fisiológica. Assim, especificamente, as concentrações de NaCl na faixa de 50 a 500 mM, preferivelmente de 100 a 200 mM e mais especificamente cerca de 140 mM serão adequadas.

A redução subsequente da ação detergente e continuação da incubação se refere à oligomerização adicional para fornecer o globulômero Aβ(X-Y) da invenção na Publicação de Pedido Internacional número WO 04/067561 referida como oligômero B). Uma vez que a composição obtida da etapa precedente contém regularmente detergente e uma concentração de sal na faixa fisiológica, então é possível reduzir a ação do detergente e, preferivelmente, também a concentração do sal. Isso pode ser realizado por redução da concentração do detergente e sal, por exemplo, por diluição expediente com água ou um tampão de concentração de sal inferior, por exemplo, Tris-HCl, pH 7,3. Os fatores de diluição na faixa de cerca de 2 a 10, vantajosamente na faixa de cerca de 3 a 8 e, especificamente, de cerca de 4 provaram ser apropriados. A redução na ação detergente pode também ser obtida por adi-

ção de substâncias que podem neutralizar essa ação do detergente. Exemplos dessas incluem substâncias capazes de complexar com os detergentes, como substâncias capazes de estabilizar células no curso das medidas de purificação e extração, por exemplo, copolímeros de bloco EO/PO específicos, o copolímero de bloco com a marca registrada Pluronic™ F68. Alquil fenóis alcoxilados e especificamente etoxilados, tais como, os t-octilfenóis etoxilados da série Triton(R) X, especificamente Triton(R) X100, 3-(3-colamidopropildimetilamônio)-1-propanossulfonato (CHAPS(R)) ou alcoxilado e especificamente, ésteres graxos de sorbitano etoxilados, tais como aqueles da série Tween(R), especificamente, Tween(R) 20, nas faixas de concentração ao redor ou acima da concentração de micelas crítica específica, podem ser igualmente usados.

Subseqüentemente, a solução é incubada até globulômero Aβ (X-Y) ter sido produzido. Tempos de ação na faixa de várias horas, preferivelmente na faixa de cerca de 10 a 30 horas e, especificamente, na faixa de cerca de 15 a 25 horas são suficientes, quando a temperatura de ação é de cerca de 20 a 50°C e, especificamente, cerca de 35 a 40°C. A solução pode ser então concentrada e os possíveis resíduos podem ser removidos por centrifugação. Novamente, alguns minutos a 10.000 g são apropriados. O sobrenadante obtido após centrifugação contém um globulômero Aβ(X-Y) conforme descrito aqui.

Um globulômero Aβ (X-Y) pode ser finalmente recuperado, por exemplo, por ultrafiltação, diálise, precipita-

ção ou centrifugação. É adicionalmente preferido se a separação eletroforética dos globulômeros Aβ(X-Y) sob condições desnaturantes, por exemplo, por SDS-PAGE, produzir uma faixa dupla (por exemplo, com um peso molecular aparente de 38/48 kDa para Aβ(1-42) e especialmente preferido se mediante tratamento de glutardialdeído dos oligômeros, antes da separação, essas duas faixas forem fundidas em uma. É também preferido se a cromatografia de exclusão de tamanho dos globulômeros resultar em uma máxima simples (por exemplo, correspondendo a um peso molecular de aproximadamente 60 kDa para Aβ(1-42). Partindo do peptídeo A β(1-42), o processo é especificamente apropriado para obtenção dos globulômeros Aβ(1-42).

Um "efeito neuromodulador" é definido como um efeito inibidor de longa duração de um neurônio conduzindo a uma disfunção do neurônico com relação à plasticidade neuronal.

De acordo com outro aspecto da invenção, o termo "globulômero Aβ(X-Y)" aqui se refere a um globulômero consistindo essencialmente em subunidades Aβ(X-Y), onde é preferido se, em média, pelo menos 11 de 12 subunidades forem do tipo Aβ(X-Y), mais preferivelmente, se inferiores a 10% dos globulômeros compreenderem quaisquer peptídeos não Aβ(X-Y) e, mais preferivelmente, se o conteúdo dos peptídeos não Aβ(X-Y) na preparação estiver abaixo do limite de detecção. Mais especificamente, o termo "globulômero Aβ(1-42)" se refere aqui a um globulômero compreendendo unidades Aβ(1-42) conforme definido acima; o termo "globulômero Aβ(12-42) aqui

se refere a um globulômero compreendendo unidades Aβ(12-42) conforme definido acima; e o termo "globulômero Aβ(20-42)" aqui se refere a um globulômero compreendendo unidades Aβ(20-42) conforme definido acima.

O termo "globulômero Aβ(X-Y) reticulado" se refere aqui a uma molécula que pode ser obtida de um globulômero Aβ(X-Y) conforme descrito acima por reticulação, preferivelmente, reticulação química, mais preferivelmente reticulação de aldeído e, mais preferivelmente, reticulação de glutardialdeído das unidades constituintes do globulômero. Em outro aspecto da invenção, um globulômero reticulado é essencialmente um globulômero onde as unidades são pelo menos parcialmente unidas por ligações covalentes, ao invés de serem mantidas em conjunto apenas por interações não covalentes.

O termo "derivado de globulômero Aβ(X-Y)" se refere aqui, especificamente, a um globulômero que é rotulado por ser covalentemente ligado a um grupo que facilita a detecção, preferivelmente, um fluorforo, por exemplo, isotiocianato de fluoresceína, ficoeritrina, proteína fluorescente Aequorea victoria, proteína fluorescente Dictyosoma ou qualquer combinação ou derivados ativos em fluorescência dos mesmos; um cromoforo; um quimioluminoforo, por exemplo, luciferase, preferivelmente Photinus pyralis luciferase, Vibrio fischeri luciferase ou qualquer combinação ou derivados ativos de quimioluminescência dos mesmos; um grupo enzimaticamente ativo, por exemplo, peroxidase tal como, peroxidase de raiz-forte ou um derivado enzimaticamente ativo do mesmo; um grupo denso de elétrons, por exemplo, um grupo contendo

metal pesado, tal como, grupo contendo ouro; um hapteno, por exemplo, um hapteno derivado de fenol; uma estrutura fortemente antigênica, por exemplo, seqüência de peptídeo prevista para ser antigênica, tal como pelo algoritmo de Kolaskar e Tongaonkar; um aptâmero para outra molécula, um grupo quelante, por exemplo, hexaistidinila; uma estrutura de proteína natural ou derivada de natural mediando interações de proteína-proteína específicas, adicionais, por exemplo, um elemento do par fos/jun; um grupo magnético, por exemplo, um grupo ferromagnético; ou um grupo radioativo, tal como, um grupo compreendendo ^{1}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S ou ^{125}I ou qualquer combinação dos mesmos; ou a uma combinação dos mesmos; ou a um globulômero sinalizado por ser ligado covalente ou não covalentemente por interação de alta afinidade, preferivelmente, ligado covalentemente a um grupo que facilita a inativação, seqüestro, degradação e/ou precipitação, preferivelmente sinalizado com um grupo que promove degradação *in vivo*, mais preferivelmente, com ubiquitina, onde é especificamente preferido se esse oligômero sinalizado for agrupado *in vivo*; ou a um globulômero modificado por qualquer combinação dos acima. Tais grupos de rotulação e sinalização e métodos para anexação dos mesmos às proteínas são conhecidos na técnica. A rotulação e/ou sinalização pode ser realizada antes, durante ou após globulomerização. Em outro aspecto da invenção, um derivado de globulômero é uma molécula obtida de um globulômero por uma região de rotulação e/ou sinalização. Correspondentemente, o termo "derivado de monômero Aβ(X-Y)" aqui se refere, especificamente, a um monômero Aβ que é ro-

tulado ou sinalizado conforme descrito para o globulômero.

O termo "afinidade maior" se refere aqui a um grau de interação, onde o equilíbrio entre anticorpo não ligado e globulômero não ligado, por um lado e complexo de anticorpo-globulômero, por outro lado, é adicionalmente em favor do complexo. Da mesma forma, o termo "afinidade menor" se refere aqui a um grau de interação onde o equilíbrio entre anticorpo não ligado e globulômero não ligado, por um lado e complexo de anticorpo-globulômero, por outro lado é adicionalmente em favor do anticorpo não ligado e globulômero não ligado.

O termo "monômero Aβ(X-Y)" se refere aqui à forma isolada do peptídeo Aβ(X-Y), preferivelmente, uma forma do peptídeo Aβ(X-Y) que não está engajada essencialmente nas interações não covalentes com outros peptídeos Aβ. Praticamente, o monômero Aβ(X-Y) é geralmente provido na forma de uma solução aquosa. Preferivelmente, a solução monomérica aquosa contém 0,05% a 0,2%, mais preferivelmente, cerca de 0,1% de NaOH quando usado, por exemplo, para determinar a afinidade de ligação do anticorpo da presente invenção. Em outra situação preferida, a solução de monômero aquoso contém 0,05% a 0,2%, mais preferivelmente, cerca de 0,1% NaOH. Quando utilizado, pode ser expediente diluir a solução de modo apropriado. Adicionalmente, é geralmente melhor utilizar a solução dentro de duas horas, especificamente dentro de uma hora e, especialmente, dentro de 90 minutos após sua preparação.

O termo "fibrila" aqui se refere a uma estrutura

molecular que compreende agrupamentos de peptídeos Aβ(X-Y) individuais, não associados covalentemente, que mostram estrutura fibrilar sob o microscópio eletrônico, que ligam em vermelho Congo, exibem birefrigência sob luz polarizada e cujo padrão de difração de raio x é uma estrutura reticulada β. A fibrila pode também ser definida como uma estrutura molecular que pode ser obtida por um processo que compreende a agregação polimérica propriamente induzida de um peptídeo Aβ apropriado, na ausência de detergentes, por exemplo, em 0,1 M HCl, conduzindo à formação de agregados com mais de 24, preferivelmente com mais de 100 unidades. Esse processo é conhecido na técnica. De modo apropriado, a fibrila Aβ(X-Y) é empregada na forma de uma solução aquosa. Em uma concretização especificamente preferida da invenção, a solução de fibrila aquosa é fabricada por dissolução do peptídeo Aβ em NH_3OH a 0,1%, diluição da mesma 1:4 com 20 mM NaH_2PO_4, 140 mM NaCl, pH 7,4, seguido por reajuste do pH para 7,4, incubação da solução a 37°C por 20 horas, seguido por centrifugação a 10.000 g por 10 minutos e ressuspensão em 20 mM NaH_2PO_4, 140 mM NaCl, pH 7,4.

O termo "fibrila Aβ(X-Y)" aqui se refere a uma fibrila compreendendo subunidades Aβ(X-Y) onde é preferido se, em média, pelo menos 90% das subunidades forem do tipo Aβ(X-Y), mais preferido se pelo menos 98% das subunidades forem do tipo Aβ(X-Y) e, mais preferido, se o teor dos peptídeos não Aβ(X-Y) estiver abaixo do limite de detecção.

Voltando ao 8F5, conforme evidenciado pela figura 1, bem como o 8C5 (figura 8), os anticorpos monoclonais de

anticorpos específicos para globulômero Aβ(1-42), 8F5 e 8C5 reconhecem predominantemente formas de globulômero Aβ(1-42) e não preparações padrão de monômero Aβ(1-40) ou Aβ(1-42) incluindo Aβ(1-42) agregado em contraste com os anticorpos não específicos 6G1 e 6E10. Especificamente, 8F5 detecta globulômeros Aβ(1-42) apenas por PAGE-Western blot e não por análise de SDS-PAGE-Western blot indicando ligação a um epítopo de intersubunidade dissociável em detergente mais complexo na estrutura de núcleo do globulômero Aβ(1-42). Um epítopo de intersubunidade é definido como um epítopo complexo, não linear através do espaço, localizado em pelo menos duas subunidades. Mais especificamente, análise de dot-blot contra várias preparações padrão Aβ(1-42) e Aβ(1-40) mostrou diferenças significativas no reconhecimento das formas de globulômero Aβ(1-42) versus não globulômero Aβ (padrão Aβ(1-40)/(1-42), Aβ(1-42) segregado para 8F5 e 8C5 específicos, porém não para os anticorpos 6G1 não específicos para isoforma e 6E10. A especificidade do globulômero de 8F5 e 8C5, porém não de 6G1 e 6E10, foi confirmada por quantificação do globulômero Aβ(1-42), monômero Aβ(1-42), monômero Aβ(1-40) e ligação alfa da proteína percursora amilóide solúvel em ELISAs sandwich. Adicionalmente, uma vez que esses anticorpos acessam o globulômero após nativo porém não após SDS Western blotting é provável que cada anticorpo reconheça um epítopo não linear estrutural entre as subunidades na região dos aminoácidos 20 e 30 de Aβ(1-42). Tal especificidade para globulômeros é importante, porque o alvejamento específico da forma do globulômero de Aβ com um anticorpo preferencial

para o globulômero, tal como, por exemplo, 8F5 ou 8C5: 1) evitará o alvejamento de depósitos amilóides insolúveis, a ligação aos mesmos será responsável por efeitos colaterais inflamatórios observados durante as imunizações com Aβ insolúvel; 2) poupará os monômeros Aβ e APP que são reportados como possuindo funções fisiológicas pré-cognitivas (Plan e outros, J. of Neuroscience 23:5531-5535 (2003); e 3) aumentará a biodisponibilidade do anticorpo, uma vez que ele não será sombreado ou se tornará inacessível através de ligação extensa aos depósitos insolúveis.

A presente invenção também inclui seqüências de nucleotídeo isolado (ou fragmentos das mesmas) codificando as cadeias leve e pesada variáveis do anticorpo monoclonal 8F5 e 8CD, bem como aquelas seqüências de nucleotídeo (ou fragmentos das mesmas) possuindo seqüências compreendendo, correspondendo, idênticas, hibridizáveis ou complementares a pelo menos cerca de 70% (por exemplo, 70% 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78% ou 79%), preferivelmente pelo menos, cerca de 80% (por exemplo, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% ou 89%), e mais preferivelmente pelo menos, cerca de 90% (por exemplo, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) de identidade com aqueles codificando seqüências de nucleotídeo. Todos os inteiros (e porções dos mesmos) entre e incluindo 70% e 100% são considerados como estando dentro do escopo da presente invenção com relação à porcentagem de identidade). Tais seqüências podem ser derivadas de qualquer fonte (por exemplo, tanto isoladas de uma fonte natural, produzida através de uma via semi-sintética,

quanto sintetizadas *de novo*). Especificamente, tais seqüências podem ser isoladas ou derivadas de fontes que não as descritas nos exemplos (por exemplo, bactérias, fungos, algas, camundongo ou seres humanos).

Além das seqüências de nucleotídeo descritas acima, a presente invenção também inclui seqüências de aminoácido de cadeias leves e pesadas variáveis de anticorpo monoclonal 8F5 e anticorpo monoclonal 8C5 (ou fragmentos dessas seqüências de aminoácido). Adicionalmente, a presente invenção também inclui seqüências de aminoácido (ou fragmentos das mesmas) compreendendo, correspondendo, idênticas ou complementares a pelo menos, cerca de 70%, preferivelmente pelo menos, cerca de 80%, e mais preferivelmente pelo menos, cerca de 90% de identidade em relação a seqüência de aminoácidos das proteínas da presente invenção. (Novamente, todos os inteiros (e porções dos mesmos) entre e incluindo 70% e 100% (conforme citado em conexão com as identidades da seqüência de nucleotídeo citadas acima) são também consideradas como estando dentro do escopo da presente invenção com relação a porcentagem de identidade).

Para fins da presente invenção, um "fragmento" da seqüência de nucleotídeo é definido como uma seqüência contínua de aproximadamente pelo menos 6, preferivelmente pelo menos, cerca de 8, mais preferivelmente pelo menos, cerca de 10 nucleotídeos e mesmo mais preferivelmente pelo menos, cerca de 15 nucleotídeos correspondendo a uma região da seqüência de nucletodídeo especificada.

O termo "identidade" se refere à correlação de du-

as seqüências em uma base nucleotídeo-por-nucleotídeo em uma janela ou segmento de comparação específico. Assim, a identidade é definida como o grau de semelhança, correspondência ou equivalência entre os mesmos filamentos (tanto sentido ou anti-sentido) de dois segmentos de DNA (ou duas seqüências de aminoácido). "Porcentagem de identidade da seqüência " é calculada por comparação de duas seqüências otimamente alinhadas em relação a uma região específica, determinando o número de posições nas quais a base ou aminoácido idêntico ocorre em ambas seqüências, a fim de obter o número de posições combinadas, dividindo o número de tais posições pelo número total de posições no segmento sendo comparado e multiplicando o resultado por 100. O alinhamento ótimo das seqüências pode ser conduzido pelo algoritmo de Smith & Waterman, Appl. Math. 2:482 (1981), pelo algoritmo de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), pelo método de Pearson S-Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85:2444 (1988) e pelos programas de computador que implementam os algoritmos relevantes (por exemplo, Clustal Macaw Pileup (http://cmgm.Stanford.edu/biochem218/11Multiple. pdf; Higgins e outros, CABIOS. 5L151-153 (1989)), FASTDB (Intelligenetics), BLAST (National Center for Biomedical Information; Altschul e outros, Nucleic Acids Research 25:3389-3402 (1997)), PILEUP (Genetics Computer Group, Madison, WI) ou GAP, BESTFIT, FASTA and TFASTA (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, Madison, WI). (vide Patente US número 5.912.120).

Para fins da presente invenção, "complementarida-

de" é definida como o grau de relação entre dois segmentos de DNA. Ela é determinada por medição da capacidade do filamento de sentido de um segmento de DNA de hibridizar com o filamento de anti-sentido de outro segmento de DNA, sob condições apropriadas para formar uma hélice dupla. Um "complemento" é definido como uma seqüência que emparelha com uma dada seqüência com base nas regras de emparelhamento de base canônica. Por exemplo, uma seqüência A-G-T em um filamento de nucleotídeo é "complementar" a T-C-A em um outro filamento.

Na hélice dupla, adenina aparece em um filamento, timina aparece no outro filamento. Similarmente, se a guanina for encontrada em um filamento, a citocina será encontrada no outro. Quando maior o relacionamento entre as seqüências de nucleotídeo de dois segmentos de DNA, maior a capacidade de formar duplexos híbridos entre os filamentos dos dois segmentos de DNA.

"Similarmente" entre duas seqüências de aminoácido é definida como a presença de uma série de resíduos de aminoácido, bem como resíduos de aminoácido conservados em ambas seqüências. Quanto maior o grau de similaridade entre duas seqüências de aminoácido, maior a correspondência, semelhante ou equivalência duas seqüências. ("Identidade entre duas seqüências de aminoácido é definida como a presença de uma série de resíduos de aminoácido exatamente semelhantes ou invariáveis em ambas seqüências). As definições de "complementaridade", "identidade" e "semelhança" são bem conhecidas dos versados na técnica comum.

"Codificada por" se refere à seqüência de ácido

nucléico que codifica uma seqüência de polipeptídeo, onde a seqüência de polipeptídeo ou uma porção da mesma contém uma seqüência de aminoácido de pelo menos 3 aminoácidos, mais preferivelmente de pelo menos 8 aminoácidos e, mesmo mais preferivelmente pelo menos 15 aminoácidos de um polipeptídeo codificado pela seqüência de ácido nucléico.

Adicionalmente, uma molécula de ácido nucléico é "hibridizável" em outra molécula de ácido nucléico, quando uma forma filamentada simples da molécula do ácido nucléico puder recombinar em outra molécula de ácido nucléico sob condições apropriadas de temperatura e resistência iônica (vide Sambrook e outros, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda edição (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York)). As condições de temperatura e resistência iônica determinam a "estringência" da hibridização.

O termo "hibridização" conforme usado aqui é empregado geralmente para significar hibridização dos ácidos nucléicos em condições apropriadas de estringência, conforme seria prontamente evidente dos versados na técnica dependendo da natureza da seqüência de sonda e seqüências alvo. As condições de hibridização e lavagem são bem conhecidas na técnica e o ajuste das condições dependendo da estringência desejada por variação do tempo de incubação, temperatura e/ou resistência iônica da solução é prontamente realizado. Vide, por exemplo, Sambrook, J. e outros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edição, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989, conforme citado acima e in-

corporado aqui como referência. (Vide também Short Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel e outros e Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, "Overview of Principles of Hybridization and the Strategy of Nucleic Acid Assays" (1993), ambos incorporados aqui como referência). Especificamente, a escolha das condições é ditada pelo comprimento das seqüências sendo hibridizadas, especificamente, o comprimento da seqüência de sonda, o teor de G-C relativo dos ácidos nucléicos e a quantidade de não combinações a serem permitidas. Condições de baixa estringência são preferidas quando se deseja hibridização parcial entre filamentos que possuem graus menores de complementaridade. Quando uma complementaridade perfeita ou quase perfeita é desejada, condições de alta estringência são preferidas. Para as condições típicas de estringência alta, a solução de hibridização contém 6 X S.S.C., 0,01 M EDTA, 1 x solução de Denhardt e 0,5% de SDS. A hibridização é realizada a cerca de 68°C por cerca de 3 a 4 horas para fragmentos de DNA clonado e por cerca de 12 a cerca de 16 horas para DNA eucariótico total. Para estringências moderadas, pode ser utilizada pré-hibridização de filtro e hibridização com uma solução de 3 x cloreto de sódio, citrato de sódio (SSC), formamida a 50% (0,1M desse tampão em pH 7,5) e 5 x solução de Denhardt. Pode-se então pré-hibridizar a 37°C por 4 horas, seguido por hibridização a 37°C com uma quantidade de sonda rotulada igual a 3.000.000 cpm total por 16 horas, seguido por uma lavagem em 2 x SSC e 0,1% de solução SDS, uma lavagem de 4 vezes por 1

minuto cada a temperatura ambiente e 4 vezes a 60°C por 30 minutos cada. Após a secagem é exposta à película. Para estringências inferiores, a temperatura da hibridização é reduzida para cerca de 12°C abaixo da temperatura de fusão (T_m) do duplexo. A t_m é conhecida como sendo uma função do teor de G-C e comprimento do duplexo, bem como resistência iônica da solução.

A "hibridização" requer que dois ácidos nucléicos contenham seqüências complementares. Contudo, dependendo da estringência da hibridização, não combinações entre bases podem ocorrer. Conforme citado acima, a estringência apropriada para hibridização de ácidos nucléicos depende do comprimento dos ácidos nucléicos e do grau de complementação. Tais variáveis são bem conhecidas na técnica. Mais especificamente, quanto maior o grau de similaridade ou homologia entre duas seqüências de nucleotídeo, maior o valor de Tm para híbridos dos ácidos nucléicos possuindo aquelas seqüências. As equações para cálculo de Tm foram derivadas para híbridos de mais de 100 nucleotídeos de comprimento (vide Sambrook e outros, supra). Para hibridização com ácidos nucléicos mais curtos, a posição de não combinações se torna mais importante e o comprimento do oliognucleotídeo determina sua especificidade (vide Sambrook e outros, supra).

Conforme usado aqui, um "fragmento de ácido nucléico isolado ou seqüência" é um polímero de RNA ou DNA que é de filamento simples ou duplo, opcionalmente contendo bases de nucleotídeo sintéticas, não naturais ou alteradas. Um fragmento de ácido nucléico isolado na forma de um polímero

de DNA pode ser compreendido de um ou mais segmentos de DNAc, DNA genômico ou DNA sintético. (Um "fragmento" de um polinucleotídeo específico se refere a uma seqüência de polinucleotídeo que compreende uma seqüência contínua de cerca de pelo menos 6 nucleotídeos, preferivelmente pelo menos cerca de 8 nucleotídeos, mais preferivelmente pelo menos cerca de 10 nucleotídeos e mesmo mais preferivelmente pelo menos cerca de 15 nucleotídeos e o mais preferível de pelo menos cerca de 25 nucleotídeos idênticos ou complementares a uma região da seqüência de nucleotídeo especifica). Nucleotídeos (geralmente encontrados em sua forma de 5'-monofosfato) são referidos por sua última designação de letra como se segue: "A" para adenilato ou desoxiadenilato (para RNA ou DNA, respectivamente), "C" para citidilato ou desoxicitidilato, "G" para guanilato ou desoxiguanilato, "U" para uridilato, "T" para desoxitimidilato, "R" para purinas (A ou G), "Y" para pirimidinas (C ou T), "K" para G ou T, "H" para A ou C ou T, "I" para inosina e "N" para qualquer nucleotídeo.

Os termos "fragmento ou subfragmento que é funcionalmente equivalente" e "fragmento funcionalmente equivalente ou subfragmento" são usados aqui intercambiavelmente. Esses termos se referem a uma porção ou subseqüência de um fragmento de ácido nucléico isolado onde a capacidade de alterar a expressão gênica ou produzir um determinado fenotipo é mantida se ou não o fragmento ou subfragmento codificar uma enzima ativa. Por exemplo, o fragmento ou subfragmento pode ser usado no projeto de construções quiméricas para

produzir o fenotipo desejado em uma planta transformada. Construções quiméricas podem ser projetadas para uso na co-supressão ou anti-sentido por ligação a um fragmento de ácido nucléico ou subfragmento do mesmo, se ou não codificando uma enzima ativa, na orientação apropriada em relação a uma seqüência promotora de planta.

Os termos "homologia", "homólogo", "substancialmente semelhante" e "correspondendo substancialmente" são usados aqui intercambiavelmente. Eles se referem aos fragmentos de ácido nucléico onde alterações em uma ou mais bases de nucleotídeo não afetam a capacidade do fragmento do ácido nucléico de medir a expressão gênica ou produzir um determinado fenotipo. Esses termos também se referem às modificações dos fragmentos do ácido nucléico da presente invenção, tal que a deleção ou inserção de um ou mais nucleotídeos que substancialmente não alteram as propriedades funcionais do fragmento de ácido nucléico resultante em relação ao fragmento inicial, não modificado. Fica portanto entendido, conforme os versados na técnica apreciarão, que a invenção engloba mais que as seqüências exemplares específicas.

"Gene" se refere a um fragmento de ácido nucléico que expressa uma proteína especifica, incluindo seqüências reguladoras procedendo (seqüências de não codificação 5') e seguindo (seqüências de não codificação 3') e a seqüência de codificação.

"Gene nativo" se refere a um gene conforme encontrado na natureza com suas próprias seqüências reguladoras. Em contraste "construção quimérica" se refere a uma combina-

ção de fragmentos de ácido nucléico que não são normalmente encontrados na natureza. Consequentemente, uma construção quimérica pode compreender seqüências reguladoras e seqüências de codificação que são derivadas de fontes diferentes ou seqüências reguladoras e seqüências de codificação derivadas da mesma fonte, porém dispostas de modo diferente em relação ao modo normalmente encontrado na natureza. (O termo "isolada" significa que a seqüência é removida de seu ambiente natural).

Um gene "estranho" se refere a um gene que não é normalmente encontrado no organismo hospedeiro, porém que é introduzido no organismo hospedeiro por transferência gênica. Genes estranhos podem compreender genes nativos inseridos em um organismo não nativo ou construções quiméricas. Um "transgene" é um gene que foi introduzido no genoma por um procedimento de transformação.

"Seqüência de codificação" se refere a uma seqüência de DNA que codifica uma seqüência de aminoácido específica. "Seqüências reguladoras" se refere às seqüências de nucleotídeo localizadas a montante (seqüências de não codificação 5'), dentro ou a jusante (seqüências de não codificação 3') de uma seqüência de codificação e que influenciam a transcrição, processamento de RNA ou estabilidade ou tradução da seqüência de codificação associada. Seqüências reguladoras podem incluir, porém não estão limitadas aos promotores, seqüências líder de tradução, introns e seqüências de reconhecimento de poliadenilação.

"Promotor" ou "seqüência gênica reguladora" se re-

fere a uma seqüência de DNA capaz de controlar a expressão de uma seqüência de codificação ou RNA funcional. A seqüência consiste nos elementos proximal e a montante mais distais, os últimos elementos freqüentemente referidos como melhoradores. Consequentemente, um "melhorador" é uma seqüência de DNA que pode estimular a atividade da seqüência gênica reguladora ou promotora e pode ser um elemento inato do promotor ou um elemento heterólogo inserido para melhorar o nível ou especificidade do tecido de um promotor. As seqüências promotoras podem também estar localizadas dentro das porções transcritas dos genes e/ou a jusante das seqüências transcritas. Os promotores podem ser derivados em sua totalidade de um gene nativo ou serem compostos de diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados na natureza ou mesmo compreenderem segmentos de DNA sintético. Fica entendido pelos versados na técnica que promotores diferentes podem direcionar a expressão de um gene em tecidos ou tipos de célula diferentes ou em estágios diferentes de desenvolvimento, ou em resposta às diferentes condições ambientais. Os promotores que fazem com que um gene seja expresso na maioria dos tipos de célula hospedeira na maioria das vezes são geralmente referidos como "promotores constitutivos". Novos promotores de vários tipos úteis nas células de plantas estão sendo contentemente descobertos, vários exemplos podendo ser encontrados na compilação de Okamuro and Goldberg, Biochemistry of Plants 15:1-82 (1989). É adicionalmente reconhecido que uma vez que na maioria dos casos os limites exatos das seqüências reguladoras não foram comple-

tamente definidos, os fragmentos de DNA de alguma variação podem ter atividade promotora idêntica.

Um "intron" é uma seqüência de intervenção em um gene que não codifica uma porção da seqüência de proteína. Assim, tais seqüências são transcritas para o RNA porém são então excisadas e não são traduzidas. O termo é também usado para as seqüências de RNA excisadas. Um "exon" é uma porção da seqüência gênica que é transcrita e é encontrada no RNA mensageiro maduro derivado do gene, porém não é necessariamente uma parte da seqüência que codifica o produto gênico final.

A "seqüência líder de tradução" se refere a uma seqüência de DNA localizada entre a seqüência promotora de um gene e a seqüência de codificação. A seqüência líder de tradução está presente em um RNAm complementa processado a montante da seqüência de início de tradução. A seqüência líder de tradução pode afetar o processamento da transcrição primária para RNAm, estabilidade do RNAm ou eficiência de tradução. Exemplos de seqüências líder de tradução foram descritos (Turner, R. and Foster, G. D. (1995) *Molecular Biotechnology* 3:225).

As "seqüências de não codificação 3'" se referem às seqüências de DNA localizadas a montante de uma seqüência de codificação e incluem seqüências de reconhecimento de poliadenilação e outras seqüências codificando sinais reguladores capazes de afetar o processamento de RNAm ou expressão gênica. O sinal de poliadenilação é geralmente caracterizado por afetar a adição dos traços do ácido poliadenílico à ex-

tremidade 3' do precursor de RNAm. O uso de diferentes seqüências de não codificação 3' é exemplificado por Ingelbrecht e outros, Plant Cell 1:671-680 (1989).

"Transcrição de RNA" se refere a um produto resultando da transcrição catalisada de RNA polimerase de uma seqüência de DNA. Quando a transcrição do RNA é uma cópia complementar perfeita da seqüência de DNA, ela é referida como transcrição primária ou pode ser uma seqüência de RNA derivada do processamento pós-transcricional da transcrição primária e é referida como RNA maduro. "RNA mensageiro (RNAm)" se refere ao RNA que está sem introns e que pode ser traduzido na proteína pela célula. "DNAc" se refere a um DNA que é complementar e sintetizado de um gabarito de RNAm usando a transcriptase inversa da enzima. O DNAc pode ser de filamento simples ou convertido na forma de filamento duplo usando o fragmento Klenow de DNA polimerase I. RNA de "sentido" se refere à transcrição do RNA que inclui o RNAm e pode ser traduzida na proteína dentro de uma célula ou *in vitro*. "RNA de anti-sentido" se refere a uma transcrição de RNA que é complementar a toda ou parte da transcrição primária alvo ou RNAm e que bloqueia a expressão de um gene alvo (Patente US número 5.107.065). A complementaridade de um RNA de anti-sentido pode ser com qualquer parte da transcrição de gene específica, isto é, na seqüência de não codificação 5', seqüência de não codificação 3', introns ou seqüência de codificação. "RNA funcional" se refere ao RNA de anti-sentido, RNA de ribozima ou outro RNA que pode não ser traduzido porém ainda possui efeito nos processos celulares. Os termos

"complemento" e "complemento reverso" são empregados aqui intercambiavelmente com relação ás transcrições de RNAm e definem o RNA de anti-sentido da mensagem.

O termo "RNA endógeno" se refere a qualquer RNA que é codificado por qualquer seqüência de ácido nucléico presente no genoma do hospedeiro antes da transformação com a construção recombinante da presente invenção, se ocorrendo naturalmente ou não naturalmente, isto é, introduzido por meio recombinante, mutagênese, etc.

O termo "não ocorrendo naturalmente" significa artificial, não consistente com o que é normalmente encontrado na natureza.

O termo "ligado operavelmente" se refere à associação das seqüências do ácido nucléico em um fragmento de ácido nucléico simples, de modo que a função de um é regulada pelo outro. Por exemplo, um promotor é operavelmente ligado a uma seqüência de codificação quando é capaz de regular a expressão daquela seqüência de codificação (isto é, aquela seqüência de codificação está sobre controle transcricional do promotor). As seqüências de codificação podem ser ligadas operavelmente às seqüências reguladoras em uma orientação de sentido ou anti-sentido. Em outro exemplo, as regiões de RNA complementares da invenção podem ser ligadas operavelmente, tanto direta quanto indiretamente, 5' ao RNAm alvo ou 3' ao RNAm alvo ou dentro do RNAm alvo ou uma primeira região complementar está em 5' e seu complemento está em 3' em relação ao RNAm alvo.

O termo "expressão", conforme usado aqui, se refe-

re à produção de um produto final funcional. A expressão de um gene envolve transcrição do gene e tradução do RNAm em um precursor ou uma proteína madura. "Inibição de anti-sentido" se refere à produção de transcritos de RNA de anti-sentido capazes de suprimir a expressão da proteína alvo. "Co-supressão" se refere à produção dos transcritos de RNA de sentido capazes de suprimir a expressão de genes idênticos ou substancialmente semelhantes ou genes endógenos (Patente US número 5.231.020).

Proteína "madura" se refere a um polipeptídeo pós-transducionalmente processado; isto é, um do qual qualquer pré- ou pró-peptídeos presentes no produto de transdução primário tenha sido removido. Proteína "precursora" se refere ao produto primário de tradução do RNAm; isto é, com pré- e pró-peptídeos ainda presentes. Os pré- e pró-peptídeos podem ser, porém não são limitados aos sinais de localização intracelulares.

"Transformação estável" se refere á transferência de um fragmento de ácido nucléico para o genoma de um organismo hospedeiro, resultando em hereditariedade geneticamente estável. Em contraste, "transformação transitória" se refere á transferência de um fragmento de ácido nucléico para o núcleo ou organela contendo DNA, de um organismo hospedeiro resultando em expressão gênica sem integração ou hereditariedade estável. Os organismos hospedeiros contendo os fragmentos de ácido nucléico transformados são referidos como organismos "transgênicos". O termo "transformação" como usado aqui se refere a ambas a transformação estável e a

transformação transitória.

DNA recombinante padrão e técnicas de clonagem molecular usadas aqui são bem conhecidas na arte e são descritas mais completamente em Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 1989 (doravante "Sambrook").

O termo "recombinante" se refere a uma combinação artificial de dois outros segmentos separados de uma seqüência, por exemplo, por síntese química ou por manipulação de segmentos isolados dos ácidos nucléicos por técnicas de engenharia genética.

"PCR" ou "Reação da Cadeia da Polimerase" é uma técnica para a síntese de grandes quantidades de segmentos de DNA específicos, consiste em uma série de ciclos repetitivos (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT). Tipicamente, o DNA filamentado duplo é desnaturado em aquecido, os dois iniciadores complementares aos limites 3' do segmento alvo são anelados em temperatura baixa e então estendidos em uma temperatura intermediária. Um conjunto dessas três etapas consecutivas é referido como um ciclo.

A reação da cadeia da polimerase ("PCR") é uma técnica potente usada para ampliar milhões de dobras do DNA, por replicação repetida de um gabarito, em um curto período de tempo. (Mullis e outros, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263-273 (1986); Erlich e outros, Pedido de Patente Europeu número 50.424; Pedido de Patente Europeu número 84.796; Pedido de Patente Europeu número 258.017; Pedido de

Patente Europeu número 237.362; Mullis, Pedido de Patente Europeu número 201.184; Mullis e outros, Patente US número 4.683.202; Erlich, Patente US número 4.582.788; e Saiki e outros, Patente US número 4.683.194). O processo utiliza conjuntos de oligonucleotídeos sintetizados *in vitro*, específicos para iniciar a síntese de DNA. O projeto dos iniciadores depende das seqüências de DNA que devem ser analisadas. A técnica é realizada através de muitos ciclos (geralmente 20-50) de fusão do gabarito em temperatura alta, permitindo que os iniciadores anelem em seqüências complementares dentro do gabarito e então replicando o gabarito com DNA polimerase.

Os produtos das reações de PCR são analisados por separação em géis agarose seguido por coloração com brometo de etídio e visualização com transiluminação de UV. Alternativamente, dNTPs radioativos podem ser adicionados à PCR, a fim de incorporar um rótulo aos produtos. Nesse caso, os produtos da PCR são visualizados por exposição do gel à película em raio x. A vantagem adicional da radiorotulação dos produtos da PCR é que os níveis dos produtos de ampliação individual podem ser quantificados.

Os termos "construção recombinante", "construção de expressão" e "construção de expressão recombinante" são usados aqui intercambiavelmente. Esses termos se referem a uma unidade funcional de material genético que pode ser inserida no genoma de uma célula usando metodologia padrão bem conhecida de um versado na técnica. Tal construção pode ser própria ou ser usada em conjunto com um vetor. Se um vetor

for usado, então a escolha do vetor depende do método que será usado para transformar as plantas hospedeiras, como é bem conhecido dos versados na técnica. Por exemplo, pode ser usado um plasmídeo. O versado na técnica têm conhecimento dos elementos genéticos que devem estar presentes no vetor, a fim de transformar, selecionar e propagar com sucesso as células hospedeiras compreendendo qualquer um dos fragmentos de ácido nucléico isolados da invenção. O versado na técnica também reconhecerá que eventos de transformação independentes e diferentes resultarão em níveis diferentes de expressão (Jones e outros, (1985) EMBO J. 4:2411-2418; De Almeida e outros, (1989) Mol. Gen. Genetics 218:78-86), e assim aqueles eventos múltiplos devem ser classificados a fim de se obter linhagens mostrando o nível de expressão desejado e o padrão. Tal classificação deve ser realizada por análise Southern do DNA, análise Northern da expressão de RNAm, análise Western da expressão da proteína ou análise fenotípica.

Um "anticorpo monoclonal" conforme usado aqui se refere a uma de uma preparação de moléculas de anticorpo contendo anticorpos que compartilham uma seqüência de aminoácido de cadeia pesada comum e de cadeia leve comum, em contraste com um anticorpo a partir de uma preparação de anticorpo "policlonal" que contém uma mistura de diferentes anticorpos. Os anticorpos monoclonais podem ser gerados por várias novas tecnologias como fago bactérias, leveduras ou mostra ribossômica, bem como métodos clássicos exemplificados por anticorpos derivados de hibridoma (por exemplo, um anticorpo secretado por um hibridoma preparado por tecnolo-

gia de hibridoma, tal como a metodologia de hibridoma padrão Kohler e Milstein ((1975) Nature 256:495-497). Assim, um anticorpo agonístico derivado de não hibridoma da invenção ainda é referido como um anticorpo monoclonal embora o mesmo possa ter sido derivado de metodologias não clássicas.

Um "anticorpo isolado" conforme usado aqui, pretende se referir a um anticorpo que é substancialmente isento de outros anticorpos possuindo especificidades antigênicas diferentes (por exemplo, um anticorpo isolado que se liga especificamente a um globulômero é substancialmente isento de anticorpos que se ligam especificamente aos antígenos diferentes de um globulômero). Um anticorpo isolado que se liga especificamente a um globulômero pode, contudo, possuir reatividade cruzada em relação a outros antígenos. Além disso, um anticorpo isolado pode ser substancialmente isento de outro material celular e/ou substâncias químicas.

O termo "porção de ligação de antígeno" de um anticorpo (ou simplesmente "porção de anticorpo") conforme usado aqui, se refere a um ou mais fragmentos de um anticorpo que mantêm a capacidade de se ligar especificamente a um antígeno. Foi mostrado que a função de ligação de antígeno de um anticorpo pode ser realizada por fragmentos de um anticorpo de comprimento pleno. Tais concretizações de anticorpo podem também ser de formatos biespecíficos, específicos duplos ou multiespecíficos; especificamente se ligando a dois ou mais antígenos diferentes. Exemplos de fragmentos de ligação englobados no termo "porção de ligação de antígeno" de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento mo-

novalente consistindo nos domínios VL, VH, CL e CH1; (ii) um fragmento $F(ab')_2$, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte de dissulfeto na região de articulação; (iii) um fragmento Fd consistindo nos domínios VH e CH1; (iv) um fragmento Fv consistindo nos domínios VL e VH de um braço simples de um anticorpo, (v) um fragmento dAB (Ward e outros, (1989) *Nature* 341:544-546), que compreende um domínio de variável simples; e (vi) uma região de determinação de complementaridade (CDR). Adicionalmente, embora os dois domínios do fragmento de Fv, VL e VH, sejam codificados por genes de separação, eles podem ser unidos, usando métodos recombinantes, por um ligante sintético que permite que os mesmos sejam fabricados como uma cadeia de proteína simples onde o par de regiões VL e VH formam moléculas monovalentes (conhecidas como Fv de cadeia simples (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 também podem estar englobados no termo "porção de ligação de antígeno" de um anticorpo. Outras formas de anticorpos de cadeia simples, tais como, diacorpos são também englobados. Os diacorpos são anticorpos bivalentes, biespecíficos, onde os domínios VH e VL são expressos em uma cadeia de polipeptídeo simples, porém usando um ligante que é muito curto para permitir emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia, pelo que forçando os domínios a emparelharem 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). Tais porções de anticorpo são conhecidas na arte (Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).

Ainda adicionalmente, um anticorpo ou porção de ligação de antígeno pode fazer parte de uma molécula de imunoadesão mais larga, formada por associação covalente ou não covalente do anticorpo ou porção do anticorpo com uma ou mais proteínas ou peptídeos. Exemplos de tais moléculas de imunoadesão incluem o uso da região de núcleo de estreptavidina para fabricação de 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 poliistidina C-terminal para fabricar moléculas de scFv bivalentes e biotiniladas (Kipriyanov, S. M., e outros (1994) Mol. Immunol. 31: 1047a-1058). As porções de anticorpo, tais como, fragmentos de Fab e $F(ab')_2$ podem ser preparadas de anticorpos integrais usando técnicas convencionais, tais como, papaína possui digestão de papaína, respectivamente, dos anticorpos integrais. Além disso, os anticorpos, porções de anticorpo e moléculas de adesão podem ser obtidos usando técnicas de DNA recombinante padrão, conforme descrito aqui.

O termo "anticorpo humano recombinante" conforme usado aqui, se destina a incluir todos os anticorpos humanos que são preparados, expressos, criados ou isolados por meio recombinante, tal como, anticorpos expressos usando um vetor

de expressão recombinante transfectado em uma célula hospedeira, anticorpos isolados de uma biblioteca de anticorpo humano combinatória, recombinante, (Hoogenboom H. R., (1997) *TIB Tech.* 15:62-70; Azzazy H., and Highsmith W. E., (2002) *Clin. Biochem.* 35:425-445; Gavilondo J.V., and Larrick J. W. (2002) *BioTechniques* 29:128-145; Hoogenboom H., and Chames P. (2000) Immunology Today 21:371-378), anticorpos isolados de um animal (por exemplo, um camundongo) que é transgênico para genes de imunoglobulina humana (vide, por exemplo, Taylor, L. D., e outros (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295; Kellermann S-A., e Green L. L. (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13:593-597; Little M. e outros (2000) *Immunology Today* 21:364-370) ou anticorpos preparados, expressos, criados ou isolados por qualquer outro meio que envolva divisão das seqüências gênicas de imunoglobulina humana com relação as outras seqüências de DNA. Tais anticorpos humanos recominantes possuem regiões variáveis e constantes derivadas das seqüências de imunoglobulina de germinal humana. Em determinadas modalidades, contudo, tais anticorpos humanos recombinantes são submetidos à mutagênese *in vitro* (ou quando um animal transgênico para seqüências Ig humanas for usado, na mutagênese somática *in vivo*) e assim as seqüências de aminoácido das regiões VH e VL dos anticorpos recombinantes são seqüências que, embora derivadas de e relacionadas às seqüências VH e VL da germinal humana, pode não existir naturalmente dentro do repertório *in vivo* de germinal de anticorpo humano. (Vide também, Kabat e outros Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição, U.S. Depart-

ment of Health and Human Services, NIH Publicação número 91-3242, 1991). Os anticorpos humanos da presente invenção, contudo, podem incluir resíduos de aminoácido não codificados por seqüências de imunoglobulina de germinal humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese aleatória ou específica de sítio *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*). (Vide também, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Gold Spring Harbor Press, 1990).

O termo "anticorpo quimérico" se refere aos anticorpos que compreendem seqüências de região variável de cadeia pesada e leve de uma espécie e seqüências de região constante de outras espécies, tais como, anticorpos possuindo regiões variáveis de cadeia leve e pesada ligadas às regiões de constante humana.

O termo "anticorpo enxertado de CDR" se refere aos anticorpos que compreendem seqüências de região variável de cadeia leve e pesada de uma espécie, porém onde as seqüências de uma ou mais das regiões de CDR de V_H e/ou VL são substituídos com seqüências de CDR de outras espécies, tais como, anticorpos possuindo regiões variáveis de cadeia leve e pesada de murino onde uma ou mais das CDRs de murino (por exemplo CDR3) foram substituídas com seqüências de CDR humana.

Os anticorpos humanos recombinantes da presente invenção possuem regiões variáveis e também podem incluir regiões constantes, derivadas das seqüências de imunoglobulina de linhagem germinal humana. (Vide Kabat e outros (1991) supra). Em determinadas modalidades, contudo, tais anticorpos humanos recombinantes podem ser submetidos a mu-

tagênese *in vitro* (ou quando for empregado um animal transgênico para seqüências Ig humanas, na mutagênese somática *in vivo*) e assim as seqüências de aminoácido das regiões V_H e V_L dos anticorpos recombinantes são seqüências que, enquanto derivadas e relacionadas às seqüências V_H e V_L da linhagem germinal humana, podem não existir naturalmente dentro do repertório da linhagem germinal de anticorpo humano *in vivo*. Contudo, em determinadas modalidades, tais anticorpos recombinantes são o resultado da mutagênese seletiva ou retromutação ou ambos.

O termo "retromutação" se refere a um processo no qual alguns ou todos os aminoácidos somaticamente mutados de um anticorpo humano são substituídos com os resíduos germinais correspondentes de uma seqüência de anticorpo germinal homóloga. As seqüências de cadeia leve e pesada de um anticorpo humano da invenção são alinhados separadamente com as seqüências germinais na base de dados VBASE para identificar a seqüência com maior homologia. VBASE é um diretório compreensivo de todas seqüências de região variável germinais humanas compiladas das seqüências publicadas, incluindo as liberações atuais do GenBank e das bibliotecas de dados EMBL. A base de dados foi desenvolvida no MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge, Reino Unido) como um depositório de genes de anticorpo humano sequenciados (website,http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase-intro.php?menu=901). As diferenças no anticorpo humano da invenção são retornadas à seqüência germinal por mutação das posições de nucleotídeo definidas codificando tais aminoácidos diferentes. O papel

de cada aminoácido assim identificado como um candidato à retromutação seria investigado para um papel direto ou indireto na ligação do antígeno, e qualquer aminoácido encontrado após mutação para afetar quaisquer características desejáveis do anticorpo humano não seria incluído no anticorpo humano final. Para minimizar o número de aminoácidos sujeitos à retromutação, aquelas posições de aminoácidos encontradas como sendo diferentes da seqüência germinal mais próxima, porém idênticas ao aminoácido correspondente em uma segunda seqüência germinal, podem permanecer, contanto que a segunda seqüência germinal seja idêntica e co-linear à seqüência de anticorpo humana da invenção, por pelo menos 10, preferivelmente 12, aminoácidos de ambos os lados do aminoácido em questão. A retromutação pode ocorrer em qualquer estágio da otimização do anticorpo.

Uma "proteína de ligação rotulada" é uma proteína onde uma porção de anticorpo ou anticorpo da invenção é derivado ou ligado a outra molécula funcional (por exemplo, outro peptídeo ou proteína). Por exemplo, uma proteína de ligação rotulada da invenção pode ser derivada por ligação funcional de um anticorpo ou porção do anticorpo da invenção (por acoplamento químico, fusão genética, associação não covalente ou de outra forma) a uma ou mais outras entidades moleculares, tais como, outro anticorpo (por exemplo, um anticorpo ou diacorpo biespecífico), um agente detectável, um agente citotóxico, um agente farmacêutico, e/ou uma proteína ou peptídeo que pode mediar associação do anticorpo ou porção do anticorpo com outra molécula (tal como uma região de

núcleo de estreptavidina ou um marcador de poliistidina).

Para fins da presente invenção, uma "proteína de ligação glicosilada" compreende uma proteína onde o anticorpo ou porção de ligação do antígeno da mesma compreende um ou mais resíduos de carboidrato. A produção de proteína nascente *in vivo* pode sofrer processamento adicional, conhecido como modificação pós-translacional. Especificamente, resíduos de açúcar (glicosila) podem ser adicionados enzimaticamente, um processo conhecido como glicosilação. As proteínas resultantes portando cadeias laterais de oligossacarídeo ligadas covalentemente são conhecidas como proteínas glicosiladas ou glicoproteínas. Os anticorpos são glicoproteínas com um ou mais resíduos de carboidrato no domínio Fc, bem como o domínio variável. Os resíduos de carboidrato no domínio Fc possuem efeito importante na função efetora do domínio Fc, com efeito mínimo na ligação do antígeno ou meia vida do anticorpo (R. Jefferis, Biotechnol. Prog. 21 (2005), pp. H-16). Em contraste, a glicosilação do domínio variável pode ter um efeito na atividade de ligação do antígeno. A glicosilação no domínio variável pode ter um efeito negativo na afinidade de ligação do anticorpo, provavelmente devido ao impedimento estérico (Co, M.S., e outros, Mol. Immunol. (1993) 30:1361-1367), ou resultar na afinidade aumentada para o antígeno (Wallick, S. C, e outros, Exp. Med. (1988) 168:1099-1109; Wright, A., e outros, EMBO J. (1991) 10:2717 2723). Adicionalmente, os mutantes de sítio de glicosilação podem ser fabricados, onde o sítio de glicosilação ligado em O ou N da proteína de ligação foi mutado. Um versado na téc-

nica pode gerar tais mutantes usando tecnologias padrão bem conhecidas. Os mutantes do sítio de glicosilação que mantêm a atividade biológica porém que aumentaram ou diminuíram a atividade de ligação são também contemplados.

Adicionalmente, a glicosilação da porção de ligação do antígeno ou anticorpo da invenção pode ser modificada. Por exemplo, um anticorpo não glicosilado pode ser fabricado (isto é, o anticorpo não possui glicosilação). A glicosilação pode ser alterada, por exemplo, para aumentar a afinidade do anticorpo com o antígeno. Tais modificações de carboidrato podem ser realizadas, por exemplo, por alteração de um ou mais sítios de glicosilação dentro da seqüência de anticorpo. Por exemplo, uma ou mais substituições de aminoácido podem ser feitas as quais resultam na eliminação de um ou mais sítios de glicosilação de região variável para dessa forma, eliminar a glicosilação naquele sítio. Tal glicosilação pode aumentar a afinidade do anticorpo com o antígeno. Tal abordagem é descrita em detalhes adicionalmente no Pedido de Publicação Internacional número WO 03/016466A2 e as Patentes US números 5.714.350 e 6.350.861 cada um dos quais é incorporado aqui como referência em sua totalidade.

Adicional ou alternativamente, um anticorpo modificado pode ser fabricado possuindo um tipo alterado de glicosilação, tal como um anticorpo hipoglicosilado possuindo quantidades reduzidas de resíduos de fucosila ou um anticorpo possuindo estruturas de GlcNAc de bisseção aumentada. Tal padrão de glicosilação alterada demonstrou aumentar a capacidade ADCC dos anticorpos. Tais modificações de carboidrato

podem ser realizadas, por exemplo, por expressão do anticorpo em uma célula hospedeira com maquinária de glicosilação alterada. As células com maquinária de glicosilação alterada foram descritas na técnica e podem ser usadas como células hospedeiras para expressar anticorpos recombinantes da invenção para dessa forma produzir um anticorpo com glicosilação alterada. (Vide, por exemplo, Shields, R. L. e outros (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana e outros (1999) Nat. Biotech. 17:176-1,, bem como, Patente Européia Número EP 1.176.195; Publicação de Pedido Internacional número WO 03/035835 e WO 99/5434280, cada uma das quais é incorporada aqui como referência em sua totalidade).

A glicosilação da proteína depende da seqüência de aminoácido da proteína de interesse, bem como da célula hospedeira na qual a proteína é expressada. Organismos diferentes podem produzir diferentes enzimas de glicosilação (por exemplo, glicosiltransferases e glicosidases) e possuem diferentes substratos (açúcares de nucleotídeo) disponíveis. Em razão de tais fatores, o padrão de glicosilação da proteína e composição de resíduos de glicosila podem diferir dependendo do sistema hospedeiro no qual a proteína específica é expressa. Os resíduos de glicosilação úteis nessa invenção podem incluir porém não estão limitados à glicose, galactose, manose, fucose, n-acetilglicosamina e ácido siálico. Preferivelmente a proteína de ligação glicosilada compreende resíduos de glicosila, tais que o padrão de glicosilação é humano.

Os versados na técnica têm conhecimento de que a

glicosilação de proteína diferente pode resultar em características de proteína diferentes. Por exemplo, a eficácia de uma proteína terapêutica produzida em um hospedeiro de microorganismo, tal como levedura e glicosilada usando a via endógena da levedura pode ser reduzida em comparação àquela da mesma proteína expressa em uma célula de mamífero, tal como uma linhagem de célula CHO. Tais glicoproteínas podem também ser imunogênicas em seres humanos e mostrar meia vida reduzida *in vivo* após administração. Receptores específicos em seres humanos e outros animais podem reconhecer resíduos de glicosila específicos e promover a retirada rápida da proteína da corrente sangüínea. Outros efeitos adversos podem incluir alterações na dobra da proteína, solubilidade, suscetibilidade às proteases, tráfego, transporte, capacidade de compartimentos, secreção, reconhecimento por outras proteína ou fatores, antigenicidade ou alergicidade. Consequentemente, um praticante pode preferir uma proteína terapêutica com uma composição específica e padrão de glicosilação, por exemplo, composição de glicosilação e padrão idêntico, ou pelo menos semelhante ao produzido nas células humanas ou nas células específicas de espécies do animal alvo pretendido.

A expressão das proteínas glicosiladas diferentes daquelas da célula hospedeira pode ser obtida por modificação genética da célula hospedeira para expressar enzimas de glicosilação heterólogas. Usando as técnicas conhecidas na arte, um praticante pode gerar anticorpos ou porções de ligação de antígeno das mesmas exibindo glicosilação de prote-

ína humana. Por exemplo, as cepas de levedura foram geneticamente modificadas para expressar enzimas de glicosilação não ocorrendo naturalmente, tal que, as proteínas glicosiladas (glicoproteínas) produzidas nessas cepas de levedura exibem glicosilação de proteína idêntica àquela das células de animais, especialmente células humana (Publicação de Pedidos de patente US números 20040018590 e 20020137134 e Publicação de Pedido Internacional número WO 05/100584 A2).

Adicionalmente, será apreciado por um versado na técnica que uma proteína de interesse pode ser expressa usando uma biblioteca de células hospedeiras construídas geneticamente para expressar várias enzimas de glicosilação, tal que, as células hospedeiras do elemento da biblioteca produzem a proteína de interesse com padrão de glicosilação variado. Um praticante pode então selecionar e isolar a proteína de interesse com padrão de glicosilação novo específico. Preferivelmente, a proteína possuindo um novo padrão de glicosilação especificamente selecionado exibe propriedades biológicas aperfeiçoadas ou alteradas.

A invenção também provê um método para fabricação dos anticorpos monoclonais da invenção a partir de animais não humanos, animais diferentes de camundongo por imunização dos animais transgênicos não humanos que compreendem local de imunoglobulina humana. Pode-se produzir tais animais usando métodos conhecidos na arte. Em uma modalidade preferida, os animais não humanos podem ser ratos, carneiros, porcos, cabras, gado ou cavalos. Os hibridomas imortalizados de produção de anticorpos podem ser preparados a partir do ani-

mal imunizado. Após imunização, o animal é sacrificado e as células B do baço são fundidas às células de mieloma imortalizadas como é conhecido na arte. Vide, por exemplo, Harlow e Lane, supra. Em uma modalidade preferida, as células do mieloma não secretam polipeptídeos de imunoglobulina (uma linhagem de célula não secretora). Após fusão e seleção antibiótica, os hibridomas são classificados usando um antígeno (por exemplo, um globulômero) ou uma porção do mesmo ou uma célula expressando o antígeno de interesse. Em uma modalidade preferida, a classificação inicial é realizada usando um imunoensaio ligado à enzima (ELISA) ou um radioimunoensaio (RIA), preferivelmente um ELISA. Um exemplo de classificação com ELISA é provido na Publicação de Pedido Internacional número WO 00/37504, incorporada aqui como referência.

Os hibridomas de produção de anticorpo são selecionados, clonados e adicionalmente classificados quanto às características desejáveis incluindo crescimento do hibridoma robusto, alta produção de anticorpo e características de anticorpo desejáveis, conforme discutido adicionalmente a seguir. Os hibridomas podem ser cultivados e expandidos *in vivo* nos animais singenéicos, em animais que não possuem um sistema imune, tais como, camundongos nus ou na cultura de célula *in vitro*. Os métodos de seleção, clonagem e expansão dos hibridomas são bem conhecidos dos versados na técnica comum. Preferivelmente, o animal imunizado é um animal não humano que expressa genes de imunoglobulina humana e as células B esplênicas são fundidas a um mieloma derivado das mesmas espécies do animal não humano.

Em outro aspecto, a invenção provê hibridomas que produzem anticorpos monoclonais a serem usados no tratamento, diagnóstico e prevenção da doença de Alzheimer. Em uma modalidade preferida, os hibridomas são hibridomas de camundongo. Em outra modalidade preferida, os hibridomas são produzidos em uma espécie não humana, diferente de camundongo, tal como, rato, carneiro, porco, cabra, gado ou cavalo. Em outra modalidade, os hibridomas são hibridomas humanos, nos quais um mieloma secretor não humano é fundido a uma célula humana expressando um anticorpo contra um globulômero.

Anticorpos recombinantes podem ser gerados de linfócitos isolados e simples usando um procedimento referido na técnica como o método de anticorpo de linfócito selecionado (SLAM), conforme descrito na Patente US número 5.627.052, Publicação de Pedido Internacional número WO 92/02551 e Babcock, J. S. e outros (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 9-3: 7843-7848. Nesse esse método, as célula simples secretando anticorpos de interesse (por exemplo, linfócitos derivados do animal imunizado) são classificados usando um ensaio de placa hemolítica específico para antígeno, onde o antígeno (por exemplo, globulômero) ou um fragmento do mesmo, é acoplado às hemácias de carneiro usando um ligante, tal como, biotina e usado para identificar células simples que secretam anticorpos com especificidade para o antígeno. Seguindo-se a identificação das células de secreção de anticorpo de interesse, DNAcs da região variável de cadeia leve e pesada são resgatados das células por PCR de transcriptase reversa e essas regiões variáveis podem então

ser expressas, no contexto das regiões constantes de imunoglobulina apropriadas (por exemplo, regiões constantes humanas), nas células hospedeiras de mamíferos, tais como, células COS ou CHO. As células hospedeiras transfectadas com as seqüências de imunoglobulina ampliadas, derivadas dos linfócitos selecionados *in vivo*, podem então sofrer análise adicional e seleção *in vitro*, por exemplo, por batear as células transfectadas para isolar as células expressando anticorpos para IL-18. As seqüências de imunoglobulina ampliadas adicionais podem ser manipuladas *in vitro* , tal como, por métodos de maturação de afinidade *in vitro*, tais como aqueles descritos na Publicação de Pedido Internacional número WO97/29131 e Publicação de Pedido Internacional número WO00/56772.

O termo "anticorpo quimérico" se refere aos anticorpos que compreendem seqüenciais de região variável de cadeia pesada e leve de uma espécie e seqüências de região constante de outras espécies, tais como, anticorpos possuindo regiões variáveis de cadeia pesada e leve de murino ligadas às regiões constantes humanas.

O termo "anticorpo enxertado por CDR" se refere aos anticorpos que compreendem seqüências de região variável de cadeia pesada e leve de uma espécie, porém onde as seqüências de uma ou mais das regiões de CDR de VH e/ou VL são substituídas com seqüências de CDR de outras espécies, tais como anticorpos possuindo regiões variáveis de cadeia pesada e leve de murino onde uma ou mais das CDRs de murino (por exemplo, CDR3) foi substituída com seqüências de CDR huma-

nas.

O termo "anticorpo humanizado" se refere aos anticorpos que compreendem seqüências de região variável de cadeia pesada e leve de espécies não humanas (por exemplo, um camundongo) porém onde pelo menos uma porção da seqüência de VH e/ou VL foi alterada para ser mais "semelhante à humana", isto é, mais semelhante às seqüências variáveis germinais humanas. Um tipo de anticorpo humanizado é um anticorpo enxertado a CDR onde as seqüências de CDR humanas são introduzidas nas seqüências de VH e VL não humanas, para substituir as seqüências de CDR não humanas correspondentes. Especificamente, o termo "anticorpo humanizado é um anticorpo ou uma variante, derivado, análogo ou fragmento do mesmo que se liga imunoespecificamente a um antígeno de interesse e que compreende uma região de estrutura (FR) possuindo substancialmente a mesma seqüência de aminoácido de um anticorpo humano e uma região de determinação de complementaridade (CDR) possuindo substancialmente a mesma seqüência de aminoácido de um anticorpo não humano. Conforme usado aqui, o termo "substancialmente" no contexto de uma CDR se refere a uma CDR possuindo uma seqüência de aminoácido pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% idêntica à seqüência de aminoácido de uma CDR de anticorpo não humana. Um anticorpo humanizado compreende substancialmente todos de pelo menos um, e tipicamente dois domínios variáveis (Fab, Fab', $F(ab')_2$, FabC, Fv) onde todas ou substancialmente todas as regiões CDR correspondente àquelas de uma imunoglobulina não

humana (isto é, anticorpo doador) e todas ou substancialmente todas as regiões de estrutura são aquelas de uma seqüência de consenso de imunoglobulina humana. Preferivelmente, um anticorpo humanizado também compreende, pelo menos, uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana. Em algumas modalidades, um anticorpo humanizado contém ambas a cadeia leve bem como pelo menos o domínio variável de uma cadeia pesada. O anticorpo pode incluir as regiões CH1, de articulação, CH2, CH3 e CH4 da cadeia pesada. Em algumas modalidades, um anticorpo humanizado contém apenas uma cadeia leve humanizada. Em outras modalidades, um anticorpo humanizado contém apenas uma cadeia pesada humanizada. Nas modalidades específicas, um anticorpo humanizado contém apenas um domínio variável humanizado de uma cadeia leve e/ou cadeia pesada humanizada.

O anticorpo humanizado pode ser selecionado de qualquer classe de imunoglobulinas, incluindo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE e qualquer isotipo incluindo, sem limitação, IgG1, IgG2, IgG2 e IgG4. O anticorpo humanizado pode compreender seqüências de mais de uma classe de isotipo e especificamente domínios constantes podem ser selecionados para otimizar as funções efetoras desejadas usando técnicas bem conhecidas na arte.

A estrutura e regiões CDR de um anticorpo humanizado não precisam corresponder precisamente às seqüências de origem, por exemplo, a CDR de anticorpo do doador ou a estrutura de consenso podem ser mutagenizadas por substitui-

ção, inserção e/ou deleção de pelo menos um resíduo de aminoácido, de modo que o resíduo da CDR ou estrutura naquele sítio não corresponda tanto ao anticorpo doador quanto à estrutura de consenso. Em uma modalidade preferida, tais mutações, contudo, não serão extensivas. Geralmente, pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90% e mais preferivelmente pelo menos 95% dos resíduos de anticorpo humanizados corresponderão àqueles das seqüências FR e CDR de origem. Conforme usado aqui, o termo "estrutura de consenso" se refere à região de estrutura na seqüência de imunoglobulina de consenso. Adicionalmente, conforme empregado aqui, o termo "seqüência de imunoglobulina de consenso" se refere à seqüência formada da maioria dos aminoácidos ocorrendo mais freqüentemente (ou nucleotídeos) em uma família de seqüência de imunoglobulina correlatas (vide, por exemplo, Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemanha, 1987). Em uma família de imunoglobulinas, cada posição na seqüência de consenso é ocupada pelo aminoácido ocorrendo mais freqüentemente naquela posição na família. Se dois aminoácidos ocorrerem igual e freqüentemente, cada um poderá ser incluído na seqüência de consenso.

O termo "atividade" inclui atividades, tais como, especificidade de ligação/afinidade de um anticorpo a um antígeno.

O termo "epítopo" inclui qualquer polipeptídeo determinante, capaz de se ligar especificamente a uma imunoglobulina ou receptor de célula T. Em determinadas modalida-

des, epítopos determinantes incluem agrupamentos de superfície quimicamente ativa de moléculas, tais como, aminoácidos, cadeias laterais de açúcar, fosforila ou sulfonila e, em determinadas modalidades, podem ter características estruturais tridimensionais específicas e/ou características de carga específicas. Um epítopo é uma região de um antígeno que é ligada por um anticorpo. Em determinadas modalidades, um anticorpo é dito como se ligando especificamente a um antígeno quando ele reconhecer, preferivelmente, seu antígeno alvo em uma mistura complexa de proteínas e/ou macromoléculas.

O termo "ressonância de plasmônio de superfície" conforme usado aqui, se refere a um fenômeno óptico que permite a análise de interações bioespecíficas em tempo real por detecção das alterações nas concentrações de proteína dentro de uma matriz de biossensor, por exemplo, usando um sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ). Para descrições adicionais vide Jönsson, U. e outros (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51: 19-26; Jönsson, U., e outros (1991) *Biotechnigues* 11:620-627; Johnsson, B., e outros (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; e Johnnson, B., e outros (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.

O termo "K_{on}", conforme empregado aqui, pretende se referir à constante "incluída na taxa" para associação de um anticorpo ao antígeno de modo a formar um complexo de anticorpo/antígeno como é conhecido na técnica.

O termo "K_{off}", conforme empregado aqui, pretende se referir à constante "fora da taxa" para dissociação de um

anticorpo do complexo de anticorpo/antígeno como é conhecido na técnica.

O termo "K_d", conforme empregado aqui, pretende se referir à "constante de dissociação" de uma interação específica de anticorpo-antígeno como é conhecido na técnica.

O termo "proteína de ligação rotulada" conforme empregado aqui, se refere à proteína com um rótulo incorporado que provê identificação da proteína de ligação. Preferivelmente, o rótulo é um marcador detectável, por exemplo, incorporação de um aminoácido radiorotulado ou anexação a um polipeptídeo de frações de biotinila que podem ser detectadas por avidina marcada (por exemplo, estreptavidina contendo um marcador fluorescente ou atividade enzimática que pode ser detectada por métodos ópticos ou colorimétricos). Exemplos de rótulos para polipeptídeos incluem, porém não estão limitados aos que se seguem: radioisótopos ou radionuclidos (por exemplo, ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{128}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho ou $^{15}3Sm$); rótulos fluorescentes (por exemplo, FITC, rodamina ou lantanídeo fosforoso), rótulos enzimáticos (por exemplo, peroxidase de raiz forte, luciferase ou fosfatase alcalina); marcadores quimioluminescentes; grupos de biotinila; epítopos de polipeptídeo predeterminados reconhecidos por um repórter secundário (por exemplo, seqüências de par leucina zipper, sítios de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação de metal ou marcadores de epítopo); e agentes magnéticos, tais como quelatos de gadolínio.

O termo "conjugado de anticorpo" se refere a uma proteína de ligação, tal como um anticorpo, quimicamente li-

gado a uma fração química secundária, tal como um agente terapêutico ou citotóxico. O termo "agente" é usado aqui para indicar um composto químico, a mistura de compostos químicos, uma macromolécula biológica ou um extrato fabricado de materiais biológicos. Preferivelmente, os agentes terapêuticos ou citotóxicos incluem, porém não estão limitados à toxina da coqueluche, taxo, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposido, tenoposido, vincristina, vinblastina, colcicina, doxorubicina, daunorobicina, antracina diona diidróxi, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotestosterona, glicocorticóides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol e puromicina, bem como análogos e homólogos desses agentes.

Os termos "cristal" e "cristalizado" conforme usado aqui se referem a um anticorpo ou uma porção de ligação do antígeno do mesmo, que existe na forma de um cristal. Os cristais são uma forma do estado sólido da matéria.

O termo "imunização" se refere a um processo de apresentação de um antígeno a um repertório imune, se aquele repertório existe em um organismo natural não alterado geneticamente ou um organismo transgênico modificado para revelar um repertório imune humano artificial. De modo semelhante, uma "preparação imunogênica" é uma formulação de antígeno eu contém adjuvantes ou outros aditivos que melhorariam a imunogenicidade do antígeno. Um exemplo disso seria a coinjeção de uma forma purificada do receptor de GLP-1 com adjuvante completo de Freund em um camundongo. "Hiperimunização" conforme definido aqui é o ato de administrar apresen-

tações múltiplas, em série, de um antígeno em uma preparação imunogênica a um animal hospedeiro com a intenção de desenvolver uma resposta imune forte.

Um modo de medir a cinética de ligação de um anticorpo é utilizar a ressonância de plasmônio de superfície. O termo "ressonância de plasmônio de superfície" conforme empregado aqui, se refere a um fenômeno óptico que permite a análise das interações bioespecíficas em tempo real por detecção de alterações nas concentrações das proteínas dentro de uma matriz biossensora, por exemplo, usando um sistema Biacore (Biacore International, Upsala, Sweden and Piscataway, NJ). Para descrições adicionais vide Jönsson e outros (1993) Annales de Biologie Clinique (Paris) 51:19-26; Jönsson e outros (1991) Biotechniques 11:620-627; Johnsson e outros (1995) Journal of Molecular Recognition 8:125-131; e Johnnson e outros (1991) Analytical Biochemistry 198:268-277.

Um "veículo farmaceuticamente aceitável" inclui qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifungos, agentes isotônicos e de retardo de absorção e semelhantes que sejam fisiologicamente compatíveis. Exemplos de veículos farmaceuticamente aceitáveis incluem ou mais dentre água, salmoura, salmoura tamponada de fosfato, dextrose, glicerol, etanol e semelhantes, bem como combinações dos mesmos. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois, tais como, manitol, sorbitol ou cloreto de sódio na composição. Veículos farmaceuticamente acei-

táveis podem compreender, adicionalmente, quantidades menores de substâncias auxiliares, tais como, agentes umectantes ou emulsionantes, preservantes ou tampões, que melhoram a vida em prateleira ou eficácia do anticorpo ou porção do anticorpo.

As composições farmacêuticas da invenção podem incluir uma "quantidade terapeuticamente eficaz" ou uma "quantidade profilaticamente eficaz" de um anticorpo ou porção de anticorpo da invenção. Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" se refere a uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para se obter o resultado terapêutico desejado. Uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo ou porção de anticorpo pode ser determinada por um versado na técnica e pode variar de acordo com fatores, tais como, estados de doença, idade, sexo e peso do indivíduo e a capacidade do anticorpo ou porção do anticorpo de promover uma resposta imune desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz é também uma na qual, qualquer efeito tóxico ou prejudicial do anticorpo ou porção de anticorpo é anulado pelos efeitos terapeuticamente benéficos. Uma "quantidade profilaticamente eficaz" se refere a uma quantidade efetiva, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para se obter o resultado profilático desejado. Tipicamente, uma vez que uma dose profilática é usada nos indivíduos antes ou em um estágio anterior ao da doença, a quantidade profilaticamente eficaz será menor em relação à quantidade terapeuticamente eficaz.

Os anticorpos e porções de anticorpos da invenção

podem ser incorporados a uma composição farmacêutica apropriada, por exemplo, para administração parenteral. Preferivelmente o anticorpo ou porções de anticorpo serão preparadas como uma solução injetável contendo 0,1-250 mg/mL de anticorpo. A solução injetável pode ser composta tanto de um líquido quanto forma de dosagem liofilisada em um ou frasco rígido ou âmbar, ampola ou seringa pré-enchida. O tampão pode ser L-histidina (1-50 mM), otimamente 5-10mM, em pH de 5,0 a 7,0 (otimamente pH 6,0). Outros tampões apropriados incluem, porém não estão limitados ao succinato de sódio, citrato de sódio, fosfato de sódio ou fosfato de potássio. O cloreto de sódio pode ser usado para modificar a toxicidade da solução em uma concentração de 0-300 mM (otimamente 150 para uma forma de dosagem liofilisada, principalmente 0-10% de sacarose (otimamente 0,5-1,0%). Outros crioprotetores apropriados incluem trealose e lactose. Os agentes de volume podem ser incluídos a uma forma de dosagem liofilisada, principalmente 1-10% de manitol (otimamente 2-4%). Os estabilizadores podem ser usados em ambas as formas de líquido e de dosagem liofilisada, principalmente 1-50mM de L-metionina (otimamente 5-10 mM). Outros agentes de volume apropriados incluem glicina, arginina podendo ser incluídos como 0-0,5% de polissorbato 80 (otimamente 0,005-0,01%). Agentes tensoativos adicionais incluem, porém não estão limitados ao polissorbato 20 e agentes tensoativos BRIJ.

As composições dessa invenção podem estar em uma variedade de formas. Essas incluem, por exemplo, formas de dosagem líquida, semi-sólida e sólida, tais como, soluções

líquidas (por exemplo, soluções injetáveis e não fundíveis), dispersões ou suspensões, comprimidos, pílulas, pós, lipossomas e supositórios. A forma preferida depende do modo pretendido de administração e aplicação terapêutica. Composições típicas preferidas estão na forma de soluções injetáveis ou fundíveis, tais como composições semelhantes àquelas usadas para imunização passiva de seres humanos com outros anticorpos. O modo preferido de administração é parenteral (por exemplo, intravenoso, subcutâneo, intraperitoneal, intramuscular). Em uma modalidade preferida, o anticorpo é administrado por infusão intravenosa ou injeção. Em outra modalidade preferida, o anticorpo é administrado por injeção intramuscular ou subcutânea.

As composições terapêuticas tipicamente devem ser estéreis e estáveis sob condições de fabricação e armazenamento. A composição pode ser formuladas como uma solução, microemulsão, dispersão, lipossoma ou outra estrutura ordenada apropriada para alta concentração do medicamento. Soluções estéreis injetáveis podem ser preparadas por incorporação do composto ativo (isto é, anticorpo ou porção do anticorpo) na quantidade necessária em um solvente apropriado com um ou uma combinação dos ingredientes enumerados acima, caso necessário, seguido por esterilização filtrada. De modo geral, as dispersões são preparadas por incorporação do composto ativo em um veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis, liofilisados para preparação das soluções estéreis injetáveis, os métodos pre-

feridos de preparação são secagem a vácuo e secagem por aspersão que rendem um pó de ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado de uma solução previamente filtrada e estéril do mesmos. A fluidez apropriada de uma solução pode ser mantida, por exemplo, por emprego de um revestimento, tal como lecitina, por manter o tamanho de partícula necessário no caso de dispersão e por uso de agentes tensoativos. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser obtida por inclusão, na composição, de um agente que retarda a absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina.

Os anticorpos e porções de anticorpos da presente invenção podem ser administrados por vários métodos conhecidos na técnica, embora para muitas aplicações terapêuticas, a via/modo preferido de administração é por injeção subcutânea, injeção intravenosa ou infusão. Conforme será apreciado pelo versado na técnica, a via e/ou modo de administração variará dependendo dos resultados desejados. Em determinadas modalidades, o composto ativo pode ser preparado com um veículo que protegerá o composto contra liberação rápida, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, emplastros dérmicos e sistemas de liberação microencapsulada. Polímeros biodegradáveis, biocompatíveis podem ser empregados, tais como, acetato de etileno vinila, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido poliláctico. Muitos métodos para preparação de tais formulações são patenteados ou geralmente conhecidos dos versados na técnica. Vide, por exemplo, *Sustained and Con-*

trolled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Em determinadas modalidades, um anticorpo ou porção de anticorpo da invenção pode ser administrada oralmente, por exemplo, com um diluente inerte ou um veículo assimilável e comestível. O composto (e outros ingredientes, caso desejado) pode também ser encoberto por uma cápsula de gelatina mole ou dura, prensado em comprimidos ou incorporado diretamente à dieta do indivíduo. Para administração terapêutica oral, os compostos podem ser incorporados com excipientes e usados na forma de comprimidos ingeríveis, comprimidos bucais, trocistos, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, comprimidos grandes e semelhantes. Para administrar um composto da invenção por outra administração parenteral, pode ser necessário revestir o composto ou co-administrar o composto com um material para prevenir sua inativação.

Compostos ativos suplementares podem também ser incorporados às composições. Em determinadas modalidades, um anticorpo ou porção de anticorpo da invenção é co-formulada com e/ou co-administrada com um ou mais agentes terapêuticos adicionais, que são úteis para tratamento da doença de Alzheimer ou doenças ou condições correlatas. Por exemplo, um dos anticorpos ou porção de anticorpo da presente invenção pode ser co-formulado e/ou co-administrado com um ou mais anticorpos adicionais que se ligam a outros alvos.

Em determinadas concretizações, um anticorpo monoclonal da presente invenção ou fragmento do mesmo pode ser ligado a um veículo de extensão de meia vida conhecido na

técnica. Tais veículos incluem, porém não são limitados ao domínio Fc, polietileno glicol e dextrano. Tais veículos são descritos, por exemplo, no Pedido US número de série 09/428.082 e Pedido PCT publicado número WO99/25044, que são incorporados aqui como referência para quaisquer fins.

Além dos procedimentos descritos acima, os praticantes estão familiarizados com os materiais de pesquisa padrão que descrevem condições específicas e procedimentos para a construção, manipulação e isolamento de macromoléculas (por exemplo, moléculas de DNA, plasmídeos, etc.), (vide por exemplo, Sambrook e outros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1989); Maliga e outros, Methods in Plant Molecular Biology, Cold Spring Harbor Press (1995); Birren e outros, Genome Analysis: Detecting Genes, 1, Cold Spring Harbor, New York (1998); Birren e outros, Genome Analysis: Analyzing DNA, 2, Cold Spring Harbor, New York (1998); Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual, eds. Clark, Springer, New York (1997)).

Empregos do Anticorpo Monoclonal

Os anticorpos monoclonais da presente invenção (por exemplo, 8F5 e 8CF) possuem muitas utilidades interessantes. Por exemplo, os anticorpos monoclonais podem ser usados na prevenção, tratamento e diagnóstico da Doença de Alzheimer, conforme descrito acima. Adicionalmente, os anticorpos podem ser empregados no desenvolvimento de anti-anticorpos. Adicionalmente, o hibridoma produzindo o respectivo anticorpo permite a produção estável de uma fonte contínua de anticorpos monoclonais idênticos (isto é, reagen-

tes) pelo que garantindo a identidade entre os anticorpos nos vários experimentos, bem como usos terapêuticos.

Também, os métodos da presente invenção permitem que se prepare as quantidades apropriadas de material de partida para uso na preparação de materiais adicionais que, por sua vez, podem ser utilizados na produção de anticorpos monoclonais (ou outros anticorpos) para o tratamento da doença de Alzheimer. Conforme citado acima, os anticorpos podem ser também empregados para imunização passiva a fim de prevenir a doença de Alzheimer ou outras condições neurológicas correlatas, caracterizadas pelos mesmos sintomas da doença de Alzheimer, tais como, comprometimento cognitivo.

Em uma modalidade de diagnóstico da presente invenção, um anticorpo da presente invenção (por exemplo, 8F5) ou uma porção do mesmo é revestido em uma fase sólida (ou está presente em uma fase líquida). A amostra de teste ou biológica (por exemplo, sangue integral, fluido cerebrospinal, soro, etc.) é então contatada com a fase sólida. Se o antígeno (por exemplo, globulômero) estiver presente na amostra, tais antígenos se ligam aos anticorpos na fase sólida e são então detectados tanto pelo método direto quanto indireto. O método direto compreende simplesmente a detecção da presença do complexo propriamente e assim a presença dos antígenos. No método indireto, um conjugado é adicionado ao antígeno de ligação. O conjugado compreende um segundo anticorpo, que se liga ao antígeno de ligação, anexado a um composto de geração de sinal ou rótulo. Se o segundo anticorpo se ligar ao antígeno de ligação, o composto de geração de

sinal gerará um sinal mensurável. Tal sinal então indicará a presença do antígeno na amostra de teste.

Exemplos de fases sólidas usadas nos imunoensaios de diagnóstico são materiais porosos e não porosos, partículas de látex, partículas magnéticas, micropartículas (vide, por exemplo, Patente US número 5.705.330), microesferas, membranas, poços de microtitulação e tubos de plástico. A escolha do material de fase sólida e método de rotulação do antígeno ou anticorpo presente no conjugado, caso desejado, são determinados com base nas características de desempenho de formato do ensaio desejado.

Conforme observado acima, o conjugado (ou reagente indicador) compreenderá um anticorpo (ou talvez anti-anticorpo, dependendo do ensaio), anexado a um composto de geração de sinal ou rótulo. Esse composto de geração de sinal ou "rótulo" é propriamente detectável ou pode ser reagido com um ou mais compostos adicionais de modo a gerar um produto detectável. Exemplos de compostos de geração de sinal incluem cromogens, radioisótopos (por exemplo, ^{125}I, ^{131}I, ^{32}P, ^{3}H, ^{35}S e ^{14}C), compostos quimioluminescentes (por exemplo, acridínio), partículas (visíveis ou fluorescentes), ácidos nucléicos, agentes complexantes ou catalisadores, tais como, enzimas (por exemplo, fosfatase alcalina, fosfatase ácida, peroxidade de raiz forte, beta-galactosidase e ribonuclease). No caso do uso da enzima (por exemplo, fosfatase alcalina ou peroxidase de raiz forte), adição de um substrato cromo-, flúor- ou lumo-gênico resulta na geração de um sinal detectável. Outros sistemas de detecção, tais como,

fluorescência decomposta com o tempo, fluorescência de reflexão interna, ampliação (por exemplo, reação da cadeia da polimerase) e espectroscopia Raman são também úteis.

Exemplos de fluidos biológicos que podem ser detectados pelos imunoensaios acima incluem plasma, sangue integral, sangue integral seco, soro, fluido cerebrospinal ou extratos aquosos ou organoaquosos de tecidos e células.

A presente invenção também engloba um método para detectar a presença de anticorpos em uma amostra de teste. Esse método compreende as etapas de: (a) contato da amostra de teste suspeita de conter anticorpos com o anti-anticorpo específico para os anticorpos na amostra do paciente, sob condições e tempo suficientes para permitir a formação de complexos de anti-anticorpo/anticorpo, onde o anticorpo é um anticorpo da presente invenção que se liga a um anticorpo na amostra do paciente; (b) adição do conjugado as complexos de anti-anticorpo/anticorpo resultantes, o conjugado compreendendo um antígeno (que se liga ao anti-anticorpo) anexado a um composto de geração de sinal capaz de detectar um sinal detectável; e (d) detecção da presença de anticorpo que podem estar presentes na amostra de teste por detecção do sinal gerado pelo composto de geração de sinal. Um controle ou calibrador pode ser usado, que compreende anticorpo para o anti-anticorpo.

A presente invenção também inclui uma vacina compreendendo um ou mais dos anticorpos descritos aqui ou uma porção dos mesmos e um adjuvante farmaceuticamente aceitável (por exemplo, adjuvante de Freund ou salmoura tamponada de

fosfato).

Os kits também estão incluídos no escopo da presente invenção. Mais especificamente, a presente invenção inclui kits para determinar a presença de antígenos (por exemplo, globulômeros) em um paciente suspeito de sofrer de doença de Alzheimer ou outra condição caracterizada por comprometimento cognitivo. Especificamente, um kit para determinar a presença de antígenos em uma amostra de teste compreende: a) um anticorpo conforme definido aqui ou porção do mesmo; e b) um conjugado compreendendo um segundo anticorpo (possuindo especificidade para o antígeno) anexado a um composto de geração de sinal, capaz de gerar um sinal detectável. O kit também pode conter um controle ou calibrador que compreende um reagente que se liga ao antígeno, bem como uma folha de instruções detalhando como o kit deve ser utilizado e os componentes do kit.

A presente invenção também inclui um kit para detectar os anticorpos em uma amostra de teste. O kit pode compreender a) um anti-anticorpo específico (por exemplo, um da presente invenção) para o anticorpo de interesse e b) um antígeno ou porção do mesmo conforme definido acima. Um controle ou calibrador compreendendo um reagente que se liga ao antígeno pode também ser incluído. Mais especificamente, o kit pode compreender: a) um anti-anticorpo (tal como o da presente invenção) específico para o anticorpo e b) um conjugado compreendendo um antígeno (por exemplo, globulômero) anexado a um composto de geração de sinal capaz de gerar um sinal detectável. Novamente, o kit pode também compreender

um controle de calibrador compreendendo um reagente que se liga ao antígeno e pode também compreender uma folha de instruções ou inserção da embalagem descrevendo como o kit deverá ser usado e os componentes do kit.

O kit também pode compreender um recipiente tal como um frasco, garrafas ou tira, com cada recipiente com uma fase sólida preestabelecida e outros recipientes contendo os respectivos conjugados. Esses kit podem também conter ampolas ou recipientes de outros reagentes necessários para realização do ensaio, tais como, reagentes para lavagem, processamento e indicadores.

Também deve ser observado que a presente invenção não inclui apenas os anticorpos de comprimento pleno descritos acima, porém também porções ou fragmentos dos mesmos, por exemplo, a porção Fab dos mesmos. Adicionalmente, a presente invenção engloba qualquer anticorpo possuindo as mesmas propriedades dos presentes anticorpos em termos, por exemplo, de especificidade de ligação, estrutura, etc.

Informações do Depósito: O hibridoma (ML5-8F5.1F2.2A2) que produz o anticorpo monoclonal 8F5 foi depositado na American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110 no dia 1° de dezembro de 2005 de acordo com os termos do Tratado de Budapeste e recebeu o número ATCC PTA-7238.

O hibridoma (ML5-8C5.2C1.8E6.2D5) que produz o anticorpo monoclonal 8C5 foi depositado na American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110 em 28 de fevereiro de 2006, de acordo com os

termos do Tratado de Budapeste e recebeu o número ATCC PTA-7407.

A presente invenção pode ser ilustrada por emprego dos exemplos não limitantes que se seguem:

EXEMPLO I(a)

PRODUÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS 8F5 E 8C5

Camundongos balb/c foram imunizados subseqüentemente com 50 microgramas de globulômero A-beta(1-42), conforme descrito em Barghorn e outros, 2005, J Neurochem, 95, 834-847 em CFA (Sigma) e receberam mais dois reforços em intervalos de um mês. Os baços foram coletados e as células do baço fundidas com células SP2/0 de mieloma de camundongo em taxa de 5:1 por um procedimento PEG. As células de fusão foram colocadas em placas de 96 poços em meio de seleção de Azaserina/Hipoxantina em 2 x 10^5 células/mL, 200 mL por poço. As células se desenvolveram para formar colônias visíveis e os sobrenadantes foram ensaiados quanto a reatividade do oligômero A-beta por um ensaio ELISA direto. Os hibridomas secretando anticorpos para os oligômeros A-beta foram subclonados por limitação da diluição, até a expressão do anticorpo parecer estável.

EXEMPLO II

LIGAÇÃO DE 8F5 E 8CT AO GLOBULÔMERO PREFERENCIAL EM COMPARAÇÃO ÀS PREPARAÇÕES DE MONÔMERO DE AB(1-40) E AB(1-42)

De modo a testar a seletividade de 8F5, duas preparações de monômero Aβ(1-42) dissolvidas de forma diferente foram empregadas, bem como Aβ(1-40) preparado recentemente

como substitutos para monômeros. Dois tipos de experimentos foram realizados. Em um primeiro experimento, 8F5 foi testado quanto à seletividade do globulômero Aβ por um ELISA-Sandwich com globulômero derivado, porém conformador Mab 6G1 não específico (vide S. Barghorn e outros J. Neurochemistry, 95:834 (2005)) como um anticorpo de captura. 8F5 biotinilado foi empregado como o segundo e anticorpo seletivo conformador. Esse experimento é descrito no Exemplo 2.1 a seguir.

Em um segundo exemplo descrito no Exemplo 2.2 a seguir, a seletividade do oligômero versus monômero Aβ(1-42) e monômero Aβ(1-40) foi examinada por imunoensaio de dot blot. Nesse experimento, 8F5 exibiu ligação preferencial ao globulômero Aβ(1-42) (em comparação ao anticorpo conhecido 4G8 mapeando para uma região semelhante como 8F5, porém derivado de imunização com um peptídeo linear Aβ(17-24) (Abeam Ltd., Cambridge, MA)), quando comparado ao monômero Aβ(1-42), bem como comparado ao monômero Aβ(1-40). 8C5 foi testado em um protocolo idêntico ao 8F5.

EXEMPLO 2.1:

SENSIBILIDADE DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS 8F5 E 8C5 AO OLIGÔMERO

a) Preparação do globulômero Aβ(1-42):

9 mg de Aβ(1-42) Fa. Bachem foram dissolvidos em 1,5 mL de HFIP (1.1.1.3.3.3 Hexafluor-2-propanol) e incubados por uma hora e meia a 37°C. A solução foi evaporada em um SpeedVac e suspensa em 396 μL de DMSO (solução de estoque de Aβ de 5 mM). A amostra foi sonicada por 20 minutos em um

banho de água sônica, agitada por 10 minutos e armazenada por toda a noite a -20°C.

A amostra foi diluída com 4,5 mL de PBS (20 mM NaH_2PO_4; 140 mM de NaCl; pH 7,4) e 0,5 mL de SDS-solução aquosa a 2% foi adicionado (teor de SDS 0,2%). A mistura foi incubada por 7 horas a 37°C, diluída com 16 mL de H_2O e adicionalmente incubada por 16 horas a 37°C. Após isso, a solução de globulômero Aβ(1-42) foi centrifugada por 20 minutos a 3.000 g. O sobrenadante foi concentrado para 0,5 mL por centriprep. de 30 kDa. O concentrado foi dialisado novamente contra 5 mM de NaH_2PO_4; 35 mM de NaCl; pH 7,4 por toda a noite a 6°C. Subseqüentemente, o concentrado de globulômero Aβ(1-42) foi centrifugado por 10 minutos a 1.000 g. O sobrenadante foi então aliquotado e armazenado a 20°C.

b) Preparação do monômero Aβ(1-42), pré-tratado com HFIP:

3 mg de Aβ(1-42) humano, (Bachem Inc). cat. Número H-1368 foram dissolvidos em 0,5 mL de HFIP (suspensão a 6 mg/mL) em um tubo Eppendorff de 1,7 mL e foram agitados (misturador Eppendorff Thermo, 1.400 rpm) por uma hora e meia a 37°C até uma solução límpida ser obtida. A amostra foi seca em um concentrador Speedvac (uma hora e meia) e ressuspensa em 13,2 μL de DMSO, agitada por 10 segundos, seguido por sonicação em banho de ultra-som (20 segundos) e agitação (por exemplo, no misturador Eppendorff Thermo, 1.400 rpm) por 10 minutos.

6 mL, 20 mM de NaH_2PO_4; 140 mM de NaCl; Pluronic F68 a 0,1%; pH 7,4 foram adicionados por uma hora a tempera-

tura ambiente. A amostra foi centrifugada por 20 minutos a 3.000 g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado dissolvido em 0,6 mL, 20 mM de NaH_2PO_4; 140 mM de NaCl; Pluronic F68 a 1%; pH 7,4. 3,4 mL de água foram adicionados e agitados por uma hora a temperatura ambiente, seguido por 20 minutos de centrifugação a 3.000 g. Alíquotas de 8 x 0,5 mL do sobrenadante foram armazenadas a -20°C.

c) Preparação do monômero Aβ(1-42) em NH_4OH:

1 mg de pó sólido de Aβ(1-42) (Bachem Inc. número cat. H-1368) foi dissolvido em 0,05 mL de NH_4OH a 0,1% em água (preparado recentemente) (2 mg/mL) e imediatamente agitado por 30 segundos a temperatura ambiente para obter uma solução límpida. A amostra foi armazenada a -20°C para uso posterior.

d) Preparação do monômero Aβ(1-40):

1 mg de Aβ(1-40) humano, (Bachem Inc) número cat. H-1194 foi suspenso em 0,25 mL de HFIP (suspensão de 4 mg/mL) em um tubo Eppendorff. O tubo foi agitado (por exemplo, em um misturador Eppendorff Thermo, 1.400 rpm) por uma hora e meia a 37°C para obter uma solução límpida e após isso seco em um concentrador Speedvac (uma hora e meia). A amostra foi redissolvida em 46 μL de DMSO (solução de 21,7 mg/mL), agitada por 10 segundos, seguido por sonicação por 20 segundos em banho de ultra-som. Após 10 minutos de agitação (por exemplo, no misturador Eppendorff, 1.400 rpm), a amostra foi armazenada a -20°C para uso posterior.

e) Biotinilação de Mab 8F5 anti-Aβ de camundongo:

500 μL de Mab 8F5 anti-Aβ de camundongo (0,64

mg/mL) em PBS foram adicionados a 2 µL, 20 mg/mL de Sulfo-NHS-Biotina (Pierce Inc. número cat. 21420) dissolvidos recentemente em água e agitados (por exemplo, em um misturador Eppendorff Thermo, 1.400 rpm), por 30 minutos, dialisados 16 horas a 6°C em um tubo de diálise contra 500 mL, 20 mM Na Pi; 140 mM de NaCl; pH 7,4. O dialisado foi armazenado a -20°C para uso adicional. 8C5 foi dessa forma biotinilado.

f) ELISA-Sandwich para as amostras Aβ:

g) Lista de Reagentes:

1. Placa F96 Cert. Maxisorp NUNC-Immuno número Cat.: 439454

2. Anticorpo de ligação:

Mab 6G1 anti-Aβ de camundongo, dissolvido em PBS; concentração: 0,4 mg/mL; armazenamento a -20°C

3. Tampão de revestimento:

100 mM de hidrogenocarbonato de sódio; pH 9,6

4. Reagente de bloqueio para ELISA; Roche Diagnostics GmbH número Cat.: 1112589

5. Tampão PBST:

20 mM de NaH_2PO_4; 140 mM de NaCl; Tween 20 a 0,05%; pH 7,4

6. Fração V de albumina bovina, isenta de protease; Serva número Cat.:11926.03; armazenamento a 4°C

7. Tampão PBST + BSA a 0,5%:

20 mM de NaH_2PO_4; 140 mM de NaCl; Tween 20 a 0,05%; pH 7,4 + BSA a 0,5%

8. Aβ (1-42)-Estoque Padrão de globulômero:

solução em 5 mM de NaH_2PO_4; 35 mM de NaCl; pH 7,4;

concentração: 10,77 mg/mL; armazenamento a -20°C

9. Monômero HFIP de Aβ(1-42) tratado com Estoque Padrão:

solução em 3 mM de NaH_2PO_4; 21 mM de NaCl; Pluronic F68 a 0,15%; pH 7,4; concentração: 0,45 mg/mL; armazenamento a -20°C

10. Monômero de Aβ(1-42) em NH_4OH Estoque Padrão; solução em 0,1% de NH_4OH, concentração: 2 mg/mL; armazenamento a -20°C

11. HFIP de monômero Aβ(1-40) tratado com Estoque Padrão; solução em DMSO; concentração: 21,7 mg/mL; armazenamento a -20°C

12. Clone de 8F5 mAb anti-Aβ de camundongo biotinilado; solução em PBS; concentração: 0,24 mg/mL; armazenamento a -80°C

13. Conjugado de estreptavidina-POD; Fa. Roche número Cat.: 1089153

14. Coloração:

TMB; Roche Diagnostics GmbH número Cat: 92817060; 42 mM em DMSO; 3% H_2O_2 em água; 100 mM de acetato de sódio, pH 4,9

15. Parada de coloração por adição de solução de ácido sulfônico 2 M

Preparação dos reagentes:

O protocolo que se segue foi utilizado:

1. Anticorpo de ligação

Descongelar solução de estoque de mMab 6G1 e diluir 1:400 em tampão de revestimento.

2. Reagente de bloqueio:

Dissolver o reagente de bloqueio em 100 mL de água para preparar a solução de estoque de bloqueio e armazenar alíquotas de 10 mL a 20°C. Diluir 3 mL da solução de estoque de bloqueio com 27 mL de água para cada placa a ser bloqueada.

3. Soluções Padrão de Aβ:

a) globulômero de Aβ(1-42)

- Adicionar 1 µL de solução de estoque padrão de globulômero Aβ(1-42) à 1.076 µL de PBST + BSA a 0,5% = 10 µg/mL

- Adicionar 50 µL de solução padrão de globulômero de Aβ(1-42) 10 µg à 4.950 µL de PBST + BSA a 0,5% = 100 ng/mL

b) tratadas com HFIP de monômero de Aβ(1-42)

- Adicionar 10 µL de solução de estoque padrão pré-tratada com HFIP de monômero Aβ(1-42) à 440 µL de PBST + BSA a 0,5% = 10 µg/mL

- Adicionar 50 µL de solução de estoque padrão pré-tratada com HFIP de monômero Aβ(1-42) à 4.950 µL de PBST + BSA a 0,5% = 10 ng/mL

c) monômero Aβ(1-42) em NH_4OH

- Adicionar 5 µL de solução de estoque padrão de NH_4OH à 995 µL de PBST + BSA a 0,5% = 10 µg/mL

- Adicionar 50 µL de monômero de Aβ(1-42) a 10 µg/mL em solução de estoque padrão de NH_4OH à 4.950 µL de PBST + BSA a 0,5% = 100 ng/mL

d) Monômero de Aβ(1-42) pré-tratado com HFIP

- Adicionar 1 μL de solução de estoque padrão pré-tratada com HFIP de monômero de Aβ(1-42) à 49 μL de PBST + BSA a 0,5% = 430 μg/mL

- Adicionar 10 μL a 430 μg/mL de solução padrão pré-tratada com HFIP de monômero de Aβ(1-40) à 420 μL de PBST + BSA a 0,5% = 10 μg/mL

- Adicionar 50 μL de solução 10 μg/mL padrão pré-tratada com HFIP de monômero de Aβ(1-40) à 4.950 μL de PBST + BSA a 0,5% = 100 ng/mL

Curvas padrão:

Número da concentração final	Estoque	PBST + BSA a 0,5%
1 100 ng/mL	2 mLS	0 mL
2 31,6 ng/mL	0,633 mL(1)	1,367 mL
3 10 ng/mL	0,633 mL(2)	1,367 mL
4 3,16 ng/mL	0,633 mL(3)	1,367 mL
5 1 ng/mL	0,633 mL(4)	1,367 mL
6 0,32 ng/mL	0,633 mL(5)	1,367 mL
7 0,1 ng/mL	0,633 mL(6)	1,367 mL
8 0,0 ng/mL	0 mL	2 mL

1. Anticorpo primário: mMAb 8F5 biotinilado:

O mAb 8F5 anti-Aβ biotinilado e concentrado foi diluído em tampão PBST + BSA a 0,5%. O fator de diluição foi de 1/1.200 = 0,2 μg/mL. O anticorpo foi usado imediatamente.

2. Reagente de rótulo:

Reconstituir o liofilisado conjugado de Estreptavidina-POD em 0,5 mL de água. Adicionar 500 μL de glicerol e armazenar alíquotas de 100 μL a -20°C para uso posterior.

Diluir o reagente de rótulo concentrado em tampão PBST. O fator de diluição é de 1/10.000. Utilizar imediatamente.

3. Coloração com Solução de TMB:

Misture 20 mL de acetato de sódio 100 mM, pH 4,9 com 200 μL da solução de TMB e 29,5 μL de solução de peróxido a 3%. Utilize imediatamente.

Elaboração da Placa de Amostras: (Observe que o padrão é operado em duplicata)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
B	31,6	31,6	31,6	31,6	31,6	31,6	31,6	31,6	31,6	31,6	31,6	31,6
C	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
D	3,16	3,16	3,16	3,16	3,16	3,16	3,16	3,16	3,16	3,16	3,16	3,16
E	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
F	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32
G	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
H	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Procedimento Utilizado:

1. Aplique 100 μL de solução de mMAb 6G1 de anti-

Aβ por poço e incube por toda a noite a 4°C.

2. Descarte a solução de anticorpo e lave os poços três vezes com 250 μL de tampão PBST;

3. Adicione 260 μL de solução de bloqueio por poço e incube por duas horas a temperatura ambiente.

4. Descarte a solução de bloqueio e lave os poços três vezes com tampão PBST.

5. Após preparação do padrão, aplique 100 μL por poço de padrão à placa. Incube por duas horas a temperatura ambiente e por toda noite a 4°C.

6. Descarte a solução padrão e lave os poços três vezes com 250 μ L de tampão PBST.

7. Adicione 200 μL de solução 8F5 de anticorpo biotinilado padrão por poço e incube por uma hora e meia a temperatura ambiente.

8. Descarte a solução de anticorpo e lave os poços três vezes com 250 μL de tampão PBST.

9. Adicione 200 μL de solução de rótulo por poço e incube uma hora a temperatura ambiente.

10. Descarte a solução de rótulo e lave três vezes os poços com 250 μL de tampão PBST.

11. Adicione 100 μL da solução de TMB a cada poço e incube a temperatura ambiente (5-15 minutos).

12. Observe a coloração e aplique 50 μL da Solução de Parada por poço após começo da coloração de fundo.

13. Leitura de UV a 450 nm.

14. Calcule os resultados da curva padrão.

15. Avaliação.

A Figura 1 mostra os resultados para anticorpo 8F% e a figura 8 para o anticorpo 8C5. Os valores Log EC50 são significativamente mais baixos para o antígeno de globulômero Aβ(1-42) (1,958) em comparação aos valores reduzidos para dois monômeros preparados de Aβ(1-42) forma diferente (2,745 e 3,003 respectivamente) e monômero Aβ(1-40) (2,825). Esses dados indicam uma seletividade de cerca de dez vezes o anticorpo 8F5 para globulômero de Aβ(1-42) versus monômero Aβ(1-42).

Resultados quase idênticos foram obtidos com anticorpo 8C5 e são mostrados na figura 8.

EXEMPLO 2.2:

SELETIVIDADE DO OLIGÔMERO DE ANTICORPO MONOCLONAL 8F5 E 8C5

- Discriminação do monômero de Aβ contra globulômero Aβ por método de dot blot: Comparação de 8F5 e 8C5 versus 4G8.

Diluições em série de globulômero de Aβ(1-42), monômero Aβ(1-42) e monômero Aβ(1-40) foram realizadas na faixa de 100 pmol/μL-0,01 pmol/μL em PBS. De cada amostra, 1 μl foi pontilhado em uma membrana de nitrocelulose. Os anticorpos monoclonais de camundongo 4G8 e 8F5 (0,2 μg/mL) foram usados para detecção com uma IgG anti-camundongo acoplados à fosfatase alcalina como anticorpo secundário e o reagente de coloração NBT/BCIP (Roche Diagnostics, Mannheim). O sinal de detecção foi analisado em sua intensidade (densidade de reflexão = RD) através de um densiômetro (GS 800, Biorad, Hercules, CA, USA) a uma concentração de antígeno de 10 pmol.

Nessa concentração para cada forma de Aβ, a densidade reflexiva medida estava na faixa linear de detecção do densiômetro. O outro anticorpo 8C5 foi empregado em um protocolo análogo. Os resultados são mostrados na Tabela 1 abaixo:

	Densidade de reflexão (RD) [10 pmol]				
	Globulômero de Aβ(1-42)	Monômero de Aβ(1-42)	Monômero de Aβ(1-40)	Razão de globulômero de Aβ(1-42)/monômero de RB Aβ(1-42)	Razão de globulômero de Aβ(1-42)/ monômero de RB Aβ(1-40)
8F5	1,6	1,1	0,1	1,4	16,9
8C5	1,3	0,2	0,3	5,1	4,1
4G8	3	3,1	0,7	1	4,2

Tabela 1: Discriminação de anticorpos anti-Aβ do monômero Aβ1-40 e monômero Aβ1-42. A discriminação foi calculada como a razão do sinal de detecção do globulômero Aβ1-42 e do monômero Aβ1-42, respectivamente o monômero Aβ1-40.

Especificamente, os resultados acima indicam que 8F5 e 8C5 mostram um perfil de ligação diferente em comparação ao anticorpo Aβ1-42 disponível comercialmente com relação ao 4G8, que mapeia em relação ao Aβ(17-24) (isto é, uma seqüência linear). Mais especificamente, 8F5 e 8C5 mostram uma preferência para ligação de globulômero versus monômero Aβ42 (vide coluna 4; comparar 1,4 versus 1) bem como uma preferência para ligação de globulômero versus Aβ40 (coluna 5; comparar 16,9 versus 4,2). Essas duas seletividades de

ligação aperfeiçoadas em relação ao padrão 4G8 resultariam na produção de alguns efeitos colaterais mediante uso de 8F5 e/ou 8C5, conforme descrito acima (por exemplo, ligação de placa).

EXEMPLO III:

LIGAÇÃO DE 8F5 E 8C5 ÀS FIBRILAS DE Aβ(1-42)

Uma vez que o anticorpo de 8F5 foi gerado contra globulômeros solúveis, foi lançada hipótese de que 8F5 não se ligaria à placa ou material de fibrila depositado. Portanto, a ligação de 8F5 às suspensões de fibrila Aβ polimerizada foi testada conforme descrito no exemplo que se segue:

Preparação de fibrilas de Aβ(1-42):

1 mg de Aβ(1-42) (Bachem Inc., número do Catálogo: H-1368) foi dissolvido em 500 μL de NH_4OH aquoso a 0,1% (tubo Eppendorff) e a amostra foi agitada por 1 minuto a temperatura ambiente, seguido por 5 minutos de centrifugação a 10.000 g. O sobrenadante foi pipetado em um novo tubo Eppendorff e a concentração de Aβ(1-42) medida de acordo com o ensaio de concentração da proteína de Bradford (procedimento de ensaio da BIO-RAD Inc.).

100 μL dessa solução de Aβ(1-42) preparada recentemente foram neutralizados com 300 μL de 20 mM NaH_2PO_4; 140 mM de NaCl; pH 7,4 seguido por HCl a 2% para ajustar o pH para 7,4. A amostra foi incubada por mais 20 horas a 37°C e centrifugada (10 minutos, 10.000 g). O sobrenadante foi descartado e a microesfera de fibrila ressuspensa com 400 μL de 20 mM de NaH_2PO_4; 140 mM de NaCl; pH 7,4 por 1 minuto agi-

tando em um misturador Vortex seguido por centrifugação (10 min, 10.000 g). Após descarte do sobrenadante, esse procedimento de ressuspensão foi repetido e a suspensão de fibrila fina girada por outra centrifugação (10 minutos, 10.000 g). O sobrenadante foi mais uma vez descartado e a microesfera final ressuspensa em 380 μL de 20 mM de NaH_2PO_4; 140 mM de NaCl; pH 7,4 com agitação por 1 minuto em um misturador Vortex. As alíquotas da amostra foram armazenadas a -20°C em um congelador.

80 μL de suspensão de fibrila foram misturados com 320 μL de 20 mM de NaH_2PO_4; 140 mM de NaCl; Tween 20 a 0,05%; pH a 7,4, tampão e agitados por 5 minutos a temperatura ambiente seguido por sonicação (20 segundos). Após centrifugação (10 minutos, 10.000 g), a microesfera foi ressuspensa com 190 μL de 20 mM NaH_2PO_4; 140 mM de NaCl; Tween 20 a 0,05%; pH 7,4 sob agitação em um misturador Vortex.

Ligação dos anticorpos às fibrilas de Aβ(1-42)

Alíquotas de 10 μL dessa suspensão de fibrila foram incubados com:

a) 10 μL de 20 mM de Na Pi; 140 mM de NaCl; pH 7,4

b) 10 μL de 0,1 μg/μL de mMAb 6E10 Signet Inc. número Cat. 9320 em 20 m

c) NaH_2PO_4; 140 mM de NaCl; pH 7,4

d) 10 μL de 0,1 μg de mMAb 4G8 Signet Inc. número Cat. 9220 em 20 mM de Na Pi; 140 mM de NaCl; pH 7,4

e) 10 μL de 0,1 μg/μL de mMAb 8F5 (8C5) em 20 mM de Na Pi; 140 mM de NaCl; pH 7,4.

As amostras foram incubadas por 20 horas a 37°C.

Finalmente as amostras foram centrifugadas (10 minutos a 10.000 g). Os sobrenadantes contendo a fração de anticorpo não ligada foram coletados e misturados com 20 μL de tampão de amostra de SDS-PAGE. As frações de microesfera foram lavadas com 50 μL DE 20 mM de NaH_2PO_4; 140 mM de NaCl; pH 7,4, tampão sob agitação de 1 minuto em um misturador Vortex seguido por centrifugação (10 minutos, 10.000 g). As microesferas finais foram ressuspensas em 20 μL de 20 mM Na Pi; 140 mM de NaCl; Tween 20 a 0,025%; pH 7,4, tampão e dissolvidas em 20 μL de tampão SDS-PAGE.

Análise de SDS-PAGE

Os sobrenadantes e amostras de microesfera ressuspensas foram aquecidos por 5 minutos a 98°C e carregados em um gel Tris/Glicina 4-20% sob as condições que se seguem:

Tampão de SDS-Amostra:

0,3 g de SDS; 0,77 g de DTT; 4 mL de 1M Tris/HCl, pH 6,8; 8 mL de glicerol; 1 mL de Bromfenolblue a 1% em Etanol; adicione água a 50 mL de Gel de Tris/Glicina a 4-20%: Invitrogen Inc., número: EC6025BOX

Tampão de operação: 7,5 g de Tris; 36 g de Glicina; 2,5 g de SDS; adicione 2,5 L de água.

A PAGE foi operada em 20 mA. Os géis foram coloridos por Coomassie Blue R250.

Resultados:

A coloração com Coomassie da SDS-PAGE indicou a presença de cadeias pesadas e leves de anticorpos predominantemente no sobrenadante e da suspensão de fibrila (raia 7, figura 2), a suspensão de fibrila que permaneceu mostrou

muito pouco material de anticorpo, enquanto também mostrou Abeta parcialmente despolarizada em 4,5 kDa. Em contraste com 8F5 e 8C5, outros anticorpos anti-Aβ não se mostraram na fração solúvel (6E10, raia 3, figura 2) ou apenas parcialmente (4G8, raia 5, figura 2) em comparação à fração ligada à fibrila (raia 6, figura 2).

A ligação relativa à fibrila tipo Abeta foi avaliada da análise de SDS-PAGE por medição dos valores de Densidade Reflexiva a partir da cadeia pesada dos anticorpos na ligação de fibrila e das frações de sobrenadante e calculada de acordo com a fórmula que se segue:

Fração de Ab ligada à fibrila = $RD_{\text{fração de fibrila}}$ x 100%/($RD_{\text{fraçaõ de fibrila}}$ + $RD_{\text{fração de sobrenadante}}$).

Os valores que se seguem foram obtidos:

Anticorpo	Fração de Ab ligada à fibrila
6E10	98%
8F5	16%
8C5	21%

Esses dados indicam uma redução significativa da ligação de 8F5 e 8C5 em comparação ao anticorpo padrão 6E10.

EXEMPLO IV

LIGAÇÃO PREFERENCIAL DOS GLOBULÔMEROS ENDÓGENOS Aβ(1-42) EM COMPARAÇÃO À Aβ(1-40)

Com base no conceito de oligômero de Aβ, é importante que os anticorpos de oligômero anti-Aβ também possam demonstrar ligação preferencial aos oligômeros Aβ(1-42) *in vivo*, especificamente, com relação ao Aβ(1-40) em pacientes com comprometimento cognitivo brando e doença de Alzheimer.

O conceito de diminuição das espécies de Aβ(1-42) em relação ao Aβ(1-40) é usado em uma abordagem terapêutica para o tratamento da doença de Alzheimer através de NSAIDs (Weggen e outros, *Nature* 414, 212-216 (2001)). Presume-se que aqueles NSAIDs com Aβ(1-42) baixo em relação ao Aβ(1-40) mostrem a melhor eficácia no tratamento da doença de Alzheimer. A razão de Aβ(1-42)/Aβ(1-40) é importante para uma terapia seletiva bem como para fins de diagnóstico.

Uma análise foi realizada com amostras de CSF com os pacientes sofrendo de doença de Alzheimer e pacientes com MCI. A partir dos resultados mostrados na figura 3 e descritos abaixo se conclui que 8F5 possui uma vantagem maior em relação aos anticorpos Aβ semelhantes à 6E10 em razão de 8F5 detectar uma razão maior de Aβ(1-42) em relação a agregação menor de Aβ(1-40). Essa vantagem permitirá um ou mais diagnósticos seletivos e neutralização de oligômeros do tipo Aβ(1-42) em MCI e pacientes sofrendo de doença de Alzheimer.

A) NÍVEIS ENDÓGENOS DE AMILÓIDE β(1-42) E AMILÓIDE β(1-40) EM CSF DE PACIENTES QUE SOFREM DE MCI E DOENÇA DE ALZHEIMER APÓS IMUNOPRECIPITAÇÃO COM OLIGÔMERO SELETIVO MAB 8F5 DE MURINO ANTI-Aβ

Imunização de mMABs anti-Aβ em relação à Sefarose 4B ativada por CNBr

a) 6E10 de mMAb, Signet Inc., número Cat 9320

b) 8F5 de mMab

0,4 g de Sefarose 4B ativada por CNBr (Amersham Pharmacia Bio-tech AB, Uppsala, Suécia, Inc., número: 17-0430-01) foi adicionado à 10 mL de 1mM HCl e incubados por

30 minutos à temperatura ambiente. A Sefarose 4B ativada por CNBr foi lavada três vezes com 10 mL de 1mM HCl e duas vezes com 10 mL de 100 mM $NaHCO_3$; 500 mM de NaCl; pH 8,3. Para cada um dos anticorpos imobilizados, foram adicionados 100 µL de Matriz de Sefarose 4B ativada por CNBr à 950 µL de 0,5 mg/mL de solução mMab de anti-Aβ em 100 mM de $NaHCO_3$; 500 mM de NaCl; pH 8,3. Após duas horas de agitação à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 10.000 g. Então, 500 µL de 100 mM de etanolamina; 100 mM de $NaHCO_3$; 500 mM de NaCl; pH 8,3 e tampão foram adicionados às microesferas e as amostras foram agitadas por uma hora a temperatura ambiente. As amostras de mMAb anti-Aβ-Sefarose foram centrifugadas por 5 minutos a 10.000 g e lavadas cinco vezes com 500 µL de 20 mM de NaH_2PO_4; 140 mM de NaCl; pH 7,4. Antes do armazenamento a 6°C, as amostras foram estabilizadas por adição de azida de sódio em concentração final de 0,02%.

Imunoprecipitação:

a) 6E10 de mMab-Sefarose

b) 8P5 de mMab-Sefarose

200 µL das amostras de fluido espinal cerebrais humanas foram diluídas com 200 µL de 20 mM de NaH_2PO_4; 140 mM de NaCl; Tween 20 a 0,05%; pH 7,4. Essas amostras foram adicionadas a 2 µL de mMab de anti-Aβ-Matriz de Sefarose e agitadas por duas horas a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 10.000 g. Os sobrenadantes foram descartados e mMAb anti-Aβ-Sefarose foi lavada duas vezes com 50 µL de PBS, agitada por 1 minuto e centrifu-

gada (5 minutos a 10.000 g). Os sobrenadantes foram descartados e as microesferas de Sefarose foram agora suspensas em 50 µL de 2 mM de NaH_2PO_4; 14 mM de NaCl, pH 7,4, seguido por 1 minuto de agitação a temperatura ambiente e 5 minutos de centrifugação a 10.000 g. Em uma próxima etapa, as microesferas de mMAb anti-Aβ-Sefarose foram tratadas com 50 µL de CH_3CN a 50%; TFA a 0,2% em água. Após 10 minutos de agitação a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas 5 minutos em 10.000 g. Os sobrenadantes foram coletados e transferidos para tubos Eppendorff de 1,5 mL. As amostras foram misturadas com 50 µL de água e evaporadas em um concentrador SpeedVac. A microesfera foi redissolvida em 4 µL de HCOOH a 70%, agitada por 10 minutos a temperatura ambiente e neutralizada com 76 µL de 1M solução de Tris e 720 µL de 20 mM de NaH_2PO_4; 140 mM de NaCl; Tween 20 a 0,05%; pH 7,4.

Amostras para determinação de formas dos monômeros Aβ(1-40); Aβ(1-42) em CSF:

a) teor de Aβ nas amostras de CSF sem imunoprecipitação:

158 µL de CSF foram diluídos com 342 µL de 20 mM de NaH_2PO_4; 140 mM de NaCl; Tween 20 a 0,05%; pH 7,4. Essa diluição de 1:3,16 foi tomada para ELISA sandwich e levada em consideração durante a avaliação.

b) Teor de Aβ em amostras de CSF após imunoprecipitação:

As amostras do procedimento mencionado acima foram tomadas para análise.

Protocolo ELISA Sandwich empregado para determinação de Aβ(1-40) em CSF:

Lista de Reagentes:

1. Placa F96 Cert. Maxisorp NUNC-Immuno número Cat.: 439454

2. Anticorpo de ligação:

6E10 clone de mAb anti-Aβ, Signet número Cat: 9320; concentração: 0,4 mg/mL Bradford (BioRad); armazenamento a -20°C

3. Tampão de acoplamento:

100 mM de hidrogenocarbonato de sódio; pH 9,6

4. Reagente de bloqueio para ELISA; Roche Diagnostics GmbH número Cat.: 1112589

5. Tampão PBST:

20 mM de NaH_2PO_4; 140 mM de NaCl; Tween 20 a 0,05%; pH 7,4

6. Padrão Aβ(1-40):

Pó sólido de Aβ(1-40); Bachem, número Cat.: H-1194; armazenamento a 20°C.

7. Anticorpo primário:

pAb de coelho Aβ(1-40); afinidade purificada; solução em PBS; concentração: 0,039 mg/mL; Signet número Cat: 9130-005; armazenamento a -20°C.

8. Reagente de rótulo:

Conjugado anti-coelho-POD; Fa. Jackson ImmunoResearch número cat.: 111-036-045;

9. Coloração:

TMB; Roche Diagnostics GmbH número Cat: 92817060;

42 mM em DMSO; 3% H_2O_2 em água; 100 mM de acetato de sódio, pH 4,9

10. Solução de parada 2M de ácido sulfônico

Protocolos empregados para preparação dos reagentes:

1. Anticorpo de ligação

6E10 mMab anti-Aβ (Signet Inc, catálogo número 9320) é diluído a uma concentração final de 0,7 µg/mL.

2. Reagente de bloqueio:

O reagente de bloqueio foi dissolvido em 100 mL de água para preparar a solução de estoque de bloqueio e armazenado em alíquotas de 10 mL a -20°C. 3 mL da solução de estoque de bloqueio são diluídos com 27 mL de água para bloqueio de uma placa de ELISA.

3. Diluição padrão da forma de monômero Aβ(1-40):

A) estoque padrão de monômero Aβ(1-40): dissolva 0,5 mg de Aβ(1-40) em 250 µL de NH_4OH a 0,1%, concentração: 2 mg/mL; preparado recentemente, utilize imediatamente

B) adicione 5 µl de solução de estoque padrão de monômero Aβ(1-40)à 995 µL de PBST = 10 µg/mL.

C) adicione 5 µL, de 10 µg de solução padrão de monômero Aβ(1-40) à 4.995 µL de PBST = 10 ng/mL.

Curvas padrão:

Número da concentração final	Estoque	PBST
1	2 mL B	0 mL
10.000 pg/mL		
2	0,633 mL(1)	1,367 mL

3.160 pg/mL		
3	0,633 mL(2)	1,367 mL
1.000 pg/mL		
4	0,633 mL(3)	1,367 mL
316 pg/mL		
5	0,633 mL(4)	1,367 mL
100 pg/mL		
6	0,633 mL(5)	1,367 mL
31,6 pg/mL		
7	0,633 mL(6)	1,367 mL
10 pg/mL		
8	0 mL	2 mL
0,0 pg/mL		

Amostras:

IP: amostras de imunoprecipitado

Número do fator de diluição	Amostra	PBST
1	0,4 mL IP	0 mL
Diretamente		
2	0,1 mL(1)	0,4 mL
1:5		
3	0,1 mL(2)	0,4 mL
1:25		
4	0,1 mL(3)	0,4 mL
1:125		

4. Anticorpo primário:

Diluir o pAb de anti-Aβ(1-40) concentrado em tampão PBST. O fator de diluição é de 1/200 = 0,2 μg/mL. Utili-

zar imediatamente.

5. Anticorpo secundário:

Conjugado de anti-coelho-POD liofilisado é dissolvido em 0,5 mL de H_2O e misturado com 500 µ de glicerol O concentrado do anticorpo é então armazenado a -20°C em alíquotas de 100 µL. O concentrado é então diluído em 1:10.000 em tampão de PBST. A solução de anticorpo é utilizada imediatamente.

6. Solução de TMB:

20 mL de 100 mM de acetato de sódio, pH 4,9 são misturados com 200 µL de solução de TMB e 29,5 µL de peróxido de hidrogênio a 3%. Essa solução é utilizada imediatamente.

Elaboração da Placa de Amostras: (Observe que o padrão e as amostras são operados em duplicata)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10.000	10.000	U1	U1								
B	3.160	3.160	U2	U2								
C	1.000	1.000	U3	U3								
D	316	316	U4	U4								
E	100	100	U5	U5								
F	31,6	31,6	U6	U6								
G	10	10	U7	U7								
H	0,0	0,0	U8	U8								

U1-U# = amostras desconhecidas

Procedimento Utilizado:

1. Aplique 100 µL de solução de anticorpo de ligação por poço e incube por toda a noite a 4°C.

2. Descarte a solução de anticorpo e lave os poços três vezes com 250 µL de tampão PBST.

3. Adicione 260 µL de solução de bloqueio por poço e incube por duas horas a temperatura ambiente.

4. Descarte a solução de bloqueio e lave os poços três vezes com 250 µL de tampão PBST.

5. Após preparação do padrão e das amostras, aplique 100 µL por poço de padrão e amostras à placa e incube por duas horas a temperatura ambiente e por toda noite a 4°C.

6. Descarte a solução de padrão/amostras e lave os poços três vezes com 250 µL de tampão PBST.

7. Adicione 200 µL da solução de anticorpo primário por poço e incube por uma hora e meia a temperatura ambiente.

8. Descarte a solução de anticorpo e lave os poços três vezes com 250 µL de tampão PBST.

9. Adicione 200 µL de solução de rótulo por poço e incube uma hora a temperatura ambiente.

10. Descarte a solução de rótulo e lave três vezes os poços com 250 µL de tampão PBST.

11. Adicione 100 µL da solução de TMB a cada poço e incube a temperatura ambiente (5-15 minutos).

12. Observe o desenvolvimento da cor e aplique 50 µL da Solução de Parada por poço.

13. Leitura a 450 nm.

14. Calcule os resultados da curva padrão.

15. Avaliação:

Se a extinção das amostras desconhecidas não estiver na faixa de linearidade da curva de calibração, repita o ELISA com diluição apropriada da amostra.

Protocolo de ELISA Sandwich empregado para determinação da forma de monômero Aβ(1-42) em CSF

Lista de Reagentes:

1. Placa F96 Cert. Maxisorp NUNC-Immuno número Cat.: 439454

2. Anticorpo de ligação:

6E10 clone de mAb anti-Aβ, Signet número Cat: 9320; concentração: 0,4 mg/mL Bradford (BioRad); armazenamento a -20°C

3. Tampão de revestimento:

100 mM de hidrogenocarbonato de sódio; pH 9,6

4. Reagente de bloqueio para ELISA; Roche Diagnostics GmbH número Cat.: 1112589

5. Tampão PBST:

20 mM de NaH_2PO_4; 140 mM de NaCl; Tween 20 a 0,05%; pH 7,4

6. Padrão Aβ(1-42):

Pó sólido de Aβ(1-42); Bachem, número Cat.: H-1368; armazenamento a 20°C.

7. Anticorpo primário:

pAb de coelho Aβ(1-42); afinidade purificada; biotinilada; solução em PBS com glicerol a 50%; concentração: 0,25 mg/mL; Signet número Cat: 9137-005; armazenamento a -20°C.

8. Reagente de rótulo:

Conjugado anti-coelho-POD; Fa. Jackson ImmunoResearch número cat.: 111-036-045;

9. Coloração:

TMB; Roche Diagnostics GmbH número Cat: 92817060; 42 mM em DMSO; 3% H_2O_2 em água; 100 mM de acetato de sódio, pH 4,9

Solução de parada: 2M de ácido sulfônico

Métodos empregados para preparação dos reagentes:

1. Anticorpo de ligação

Diluir clone 6E10 de mMab anti-Aβ 1:500 no tampão de revestimento.

2. Reagente de bloqueio:

Dissolver o reagente de bloqueio em 100 mL de água para preparar a solução de estoque de bloqueio e armazenar alíquotas de 10 mL a -20°C. Diluir 3 mL da solução de estoque de bloqueio com 27 mL de água para bloqueio de uma placa.

3. Diluição padrão da forma de monômero Aβ(1-42):

A) estoque padrão de monômero Aβ(1-42): dissolva 0,5 mg de Aβ(1-42) em 250 µL de NH_4OH a 0,1%, concentração: 2 mg/mL; preparado recentemente, utilize imediatamente.

B) adicione 5 µl de solução de estoque padrão de monômero Aβ(1-42) à 995 µL de PBST = 10 µg/mL.

C) adicione 5 µL, de 10 µg de solução padrão de monômero Aβ(1-42) à 4.995 µL de PBST = 10 ng/mL.

Curvas padrão:

Número da concentração final	Estoque	PBST

1	2 mL B	0 mL
10.000 pg/mL		
2	0,633 mL(1)	1,367 mL
3.160 pg/mL		
3	0,633 mL(2)	1,367 mL
1.000 pg/mL		
4	0,633 mL(3)	1,367 mL
316 pg/mL		
5	0,633 mL(4)	1,367 mL
100 pg/mL		
6	0,633 mL(5)	1,367 mL
31,6 pg/mL		
7	0,633 mL(6)	1,367 mL
10 pg/mL		
8	0 mL	2 mL
0,0 pg/mL		

Amostras:

IP: amostras de imunoprecipitado

Número do fator de di-	Amostra	PBST
luição		
1	0,4 mL IP	0 mL
Diretamente		
2	0,1 mL(1)	0,4 mL
1:5		
3	0,1 mL(2)	0,4 mL
1:25		
4	0,1 mL(3)	0,4 mL
1:125		

Procedimento Utilizado:

4. Anticorpo primário:

Diluir o pAb de anti-Aβ(1-42) concentrado em tampão PBST. O fator de diluição é de 1/1.250 = 0,2 µg/mL. Utilizar imediatamente.

5. Reagente de Rótulo:

Reconstituir o liofilisado do conjugado de anti-coelho-POD em 0,5 mL de água. Adicione 500 µL de glicerol e armazene em alíquotas de 100 µL a -20°C para uso posterior. Dilua o reagente de rótulo concentrado em tampão PBST. O fator de diluição é de 1/5.000. Utilize imediatamente.

6. Solução de TMB:

Misture 20 mL de 100 mM de acetato de sódio, pH 4,9 com 200 µL de solução de TMB e 29,5 µL de peróxido de hidrogênio a 3%. Utilize imediatamente.

Elaboração da Placa de Amostras: (Observe que o padrão e as amostras são operados em duplicata)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10.000	10.000	U1	U1								
B	3.160	3.160	U2	U2								
C	1.000	1.000	U3	U3								
D	316	316	U4	U4								
E	100	100	U5	U5								
F	31,6	31,6	U6	U6								
G	10	10	U7	U7								
H	0,0	0,0	U8	U8								

U1-U# = amostras desconhecidas

Procedimento Utilizado:

1. Aplique 100 µL de solução de anticorpo de ligação por poço e incube por toda a noite a 4°C.

2. Descarte a solução de anticorpo e lave os poços três vezes com 250 µL de tampão PBST.

3. Adicione 260 µL de solução de bloqueio por poço e incube por duas horas a temperatura ambiente.

4. Descarte a solução de bloqueio e lave os poços três vezes com 250 µL de tampão PBST.

5. Após preparação do padrão e das amostras, aplique 100 µL por poço de padrão e amostras à placa. Incube por duas horas a temperatura ambiente e por toda noite a 4°C.

6. Descarte a solução de padrão/amostras e lave os poços três vezes com 250 µL de tampão PBST.

7. Adicione 200 µL da solução de anticorpo primário por poço e incube por uma hora e meia a temperatura ambiente.

8. Descarte a solução de anticorpo e lave os poços três vezes com 250 µL de tampão PBST.

9. Adicione 200 µL de solução de rótulo por poço e incube uma hora a temperatura ambiente.

10. Descarte a solução de rótulo e lave três vezes os poços com 250 µL de tampão PBST.

11. Adicione 100 µL da solução de TMB a cada poço e incube a temperatura ambiente (5-15 minutos).

12. Observe a coloração e aplique 50 µL da Solução de Parada por poço.

13. Leitura a 450 nm.

14. Calcule os resultados da curva padrão.

15. Avaliação:

Se a extinção das amostras desconhecidas não estiver na faixa de linearidade da curva de calibração, repita o ELISA com diluição apropriada da amostra.

RESULTADOS:

	ELISA Aβ40 (Signet)		ELISA Aβ42 (Signet)		Aβ42/40
Amostras	Aβ(1-40)	SEM	Aβ(1-42)	SEM	
MCI (n=4)					
Sem IP	11678,9	2879,4	1242,0	353,5	7,84%
IP de 6E10	8282,4	2185,7	2035,1	280,9	17,35%
IP de 8F5	8586,1	2396,8	2654,8	411,4	20,95%
Amostras	Aβ(1-40)	SEM	Aβ(1-42)	SEM	
AD (n = 2)					
Sem IP	7297,5	1464,5	843,0	157,5	10,95%
IP de 6E10	5610,2	28,3	1453,0	14,5	20,57%
IP de 8F5					

Os resultados acima indicam o que se segue:

a. Um anticorpo preferencial de globulômero semelhante a 8F5 (ou 8C5), em comparação a um anticorpo seletivo não globulômero semelhante a 6E10 se liga preferivelmente ao Aβ42 em comparação ao Aβ40 independente do estado da doença. Esse resultado indica um tratamento de sucesso para a doença de Alzheimer, uma vez que eliminando preferivelmente Aβ42 em relação ao Aβ40 isto é seguido como um conceito no tratamento de AD, por exemplo, por uso de R-flubiprofeno, Flurizan que demonstrou eficácia no tratamento de AD em um experimento clínico publicado por Myriad Inc. Esse conceito foi pu-

blicado por S. Weggen e outros (J Biol Chem. (2003) 278 (34):31831-7). Os resultados são mostrados na figura 3.

b. Um anticorpo preferencial de globulômero semelhante a 8F5 (ou 8C5) se liga a mesmo mais ao Aβ42 que ao Aβ40 em pacientes comparados aos controles saudáveis. O resultado é mesmo mais indicativo de um tratamento de sucesso para a doença de Alzheimer, uma vez que, conforme observado acima, preferivelmente eliminando-se Aβ42 em relação ao Aβ40 isso é seguido como um conceito no tratamento de AD (por exemplo, por uso de medicamentos antiinflamatórios não esteroidais, como R-flubiprofeno). (Vide figura 3).

B) NÍVEIS ENDÓGENOS DE AMILÓIDE β(1-42) E AMILÓIDES β(1-40) EM CSF HUMANO APÓS IMUNOPRECIPITAÇÃO COM GLOBULÔMERO SELETIVO DE MAB 8F5 OU 8CR5 DE MURINO ANTI-Aβ EM COMPARAÇÃO AO GLOBULÔMERO NÃO SELETIVO 6E10 DE ANTICORPO DE GLOBULÔMERO

B1) Imunoprecipitação (IP) com Dynabeads M-280 - IgG de carneiro anti-camundongo

Soluções de abeta-anticorpo:

Os seguintes anticorpos puros foram obtidos de hibridomas de acordo com os procedimentos de purificação padrão:

- 6E10 de mMab; Fa. Signet número 9320; 1 mg/mL em tampão PBS
- 8F5 de mMab; 1,65 mg/mL em tampão PBS
- 8C5 de mMab; 1,44 mg/mL em tampão PBS

Dynabeads M-280 - IgG de carneiro anti-camundongo:

IgG de carneiro anti-camundongo (Invitrogen Inc.

número Cat.: 112.02) é covalentemente ligada às microesferas magnéticas (Dynabeads).

Ativação das Dynabeads com anticorpos monoclonais de camundongos

- A suspensão de estoque de dynabeads (Dynabeads M-280 - IgG de carneiro anti-camundongo; Produto número 112.02) foi agitada cuidadosamente para prevenir espumamento.

- 1 mL foi assepticamente removido e transferido para um frasco de reação de 1,5 mL.

- As dynabeads foram lavadas três vezes por cinco minutos com 1 mL de tampão de lavagem de imunoprecipitação (IP) (tampão de lavagem de IP: PBS (20 mM de NaH_2PO_4; 140 mM de NaCl, pH 7,4), 0,1% (peso/volume) BSA). Durante o procedimento de lavagem, o sobrenadante foi cuidadosamente removido, enquanto as dynabeads foram imobilizadas ao lado do frasco de reação com um suporte de separador magnético (MSS).

- As dynabeads lavadas foram incubadas com 40 µg de Abeta-anticorpo em 1 mL de PBS, 0,1% (peso/volume) de BSA.

- A ativação foi realizada por incubação por toda a noite sob agitação a 4°C.

- As dynabeads ativadas foram lavadas 4 vezes por 30 minutos (novamente usando o MSS) com 1 mL de tampão de lavada de IP (PBS (20 mM de NaH_2PO_4; 140 mM de NaCl, pH 7,4), 0,1% (peso/volume) BSA).

- As dynabeads ativadas foram ressuspensas com 1

mL de PBS, 0,1% (peso/volume) de BSA, 0,02 (peso/volume) % de Na-Azida; vortexada e centrifugada rapidamente.

- As dynabeads ativadas do anticorpo foram armazenadas a 4°C até serem utilizadas.

Preparação de amostra de CSF:

400 µL de CSF de um paciente sofrendo de doença de Alzheimer foram adicionados a 4 µL de Coquete Inibidor de Protease Completo (Roche Inc. número Cat.: 1697498, 1 comprimido dissolvido em 1 mL de água) e 0,8 µL de 500 mM de PMSF dissolvido em metanol. Após 10 minutos, 1,6 mL de 20 mM de NaH_2PO_4; 140 mM de NaCl, Tween 20 a 0,05%, pH 7,4 (PBST) foram adicionados.

Imunoprecipitação de espécies Abeta de AD-CSF humano:

Uma alíquota de 250 µl da amostra de CSF preparada foi adicionada à 25 µL da suspensão de Dynabeads anti-Aβ.

- a imunoprecipitação ocorreu sob agitação a 6°C por 16 horas. A lavagem subsequente das microesferas foi realizada 3 vezes por 5 minutos com 1 m de PBS/0,1% (peso/volume) de BSA e finalmente uma vez por 3 minutos com 1 m de 10 mM de tampão Tris/HCL, pH 7,5. Durante o procedimento de lavagem, o sobrenadante foi cuidadosamente removido, enquanto as dynabeads foram imobilizadas no lado do frasco de reação com um suporte de separador magnético (MSS).

O sobrenadante residual foi completamente removido após a etapa de lavagem final. Os pepetídeos de Abeta e o anticorpo correspondente foram removidos das Dynabeads por adição de 25 µL de tampão de amostra, sem β-Mercaptoetanol

(0,36 M Bistris, 0,16 M Bicina, 1% de SDS (peso/volume), 15% de sacarose (peso/volume), 0,004% de Bromfenolblue (peso/volume) ao tubo Eppendorff e aquecimento por 5 minutos a 95°C em um bloco de aquecimento. Após resfriamento para temperatura ambiente, as dynabeads foram imobilizadas na lateral do frasco de ração com um suporte de separador magnético (MSS) e o sobrenadante foi transferido para outro tubo Eppendorff (eluato de IP).

Análise dos imunoprecipitados de Abeta por uréia-PAGE seguido por procedimento Western Blot:

A quantificação das espécies Aβ1-40 e A β1-42 foi realizada por um sistema 8 M Eletroforese de Gel de Uréia Poli-Acrilamida e subsequente análise Western Blot de acordo com o procedimento descrito primeiro por H. W. Klafki e outros, Analytical Biochemistry 237, 24-29 (1996) e mais tarde também usado por J. Wiltfang e outros, J. of Neurochemistry 81, 481-496, 2002. Foram feitas apenas duas alterações pequenas no procedimento experimental:

1) concentração de SDS em empilhamento no gel foi ajustada para 0,25% (peso/volume) ao invés de 0,1% (peso/volume)

2) na Western blot, o anticorpo 1E8 (Senetek Drug Delivery Technologies Inc. St.Louis, MO, USA) foi substituído por Amilóide β anti-humano (N) (82E1) mAb de IgG de camundongo (IBL, número Cat.: 10323)

Alíquotas de 15 µL de eluato de IP das amostras imunoprecipitadas foram carregadas no 8M Uréia-PAGE. A eletroforese foi realizada em 100 V (15 minutos) e continuou a

60 V. A eletroforese parou quando a elaboração do corante azul de carga da amostra ainda esta a 0,5 cm do fim do gel.

Procedimento Western blot:

Análise Western blot foi realizada em uma câmara semi-seca de Blotting (BioRad Inc., 45 minutos a 75 mA) em 7,5 cm x 9 cm de Nitrocelulose 0,45 μm (BioRad Inc.).

Tampão de blotting: 6 g de Tris; 28,1 g de Glicina; 500 mL de Metanol; ajuste para 2,5 L com água.

O blot de nitrocelulose foi fervido por 10 minutos em PBS a 100°C. O blot foi saturado por tratamento com 40 mL 5% (peso/volume) de BSA em PBST por 1 hora a temperatura ambiente. Após remoção da fase fluída, a etapa de lavagem que se segue foi realizada duas vezes com: 50 mL de TTBS (25 mM de Tris/HCl; 150 mM de tampão NaCl; 0,05% de Tween 20; pH 7,5) por 10 minutos a temperatura ambiente e subseqüentemente com 50 m de TBS (25 mM Tris/HCl; 150 mM de tampão de NaCl; pH 7,5) por 10 minutos a temperatura ambiente. Para revelação adicional, o tampão de lavagem final foi descartado do blot e 15 mL de solução de anticorpo I (0,2 μg/mL 83E1 = 1:500 em 3% (peso/volume) de leite em pó desnatado (Lasana Inc.) em 15 mL de TBS) foram adicionados por 20 horas a 6°C. A remoção do tampão foi seguida pelas três etapas de lavagem conforme descrito acima. O blot foi incubado com solução de anticorpo II (1:10.000 diluição de anti-camundongo-POD em 15 mL a 3% (peso/volume) de leite em pó desnatado em 15 mL de TBS) por 1 hora a temperatura ambiente. A remoção do tampão foi seguida pelas três etapas de lavagem conforme descrito acima.

Após remoção do último tampão de lavagem, 2 mL de Melhorador de substrato de sensibilidade máxima Super Signal West Femto e 2 mL de solução de peróxido foram adicionados. A solução preparada recentemente foi derramada no blot que foi pré-incubado no escuro por 5 minutos. A quimioluminescência foi registrada usando um sistema de imageamento VersaDoc (BioRad).

Parâmetros de imageamento:

- tempo de exposição: 180 segundos

Registros de imagem após 30 segundos, 60 segundos, 120 segundos e 180 segundos.

Os resultados foram obtidos da imagem com tempo de exposição de 180 segundos.

	Uréia-PAGE de Aβ40 (pg/mL)	Uréia-PAGE de Aβ42 (pg/mL)	Razão de Aβ42/Aβ40+42 x 100%
IP de 6E10	4389	202	4,4%
IP de 8F5	1260	112	8,1%
IP de 8C5	1202	211	14,9%

Os resultados acima indicam que o anticorpo preferencial de globulômero semelhante a 8F5 ou 8C5, em comparação ao anticorpo seletivo não globulômero semelhante a 6E10 se liga mais ao Aβ42 que em relação ao Aβ40 no CSF humano. Esse resultado é indicativo de um tratamento de sucesso da doença de Alzheimer uma vez que, conforme citado acima, preferivelmente a eliminação de Aβ42 em relação ao Aβ40 está sendo seguida como um conceito no tratamento de AD (por exemplo, por uso de R-flubipofeno (vide acima)).

EXEMPLO V

8F5 APERFEIÇOA O NOVO RECONHECIMENTO ALVO EM CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS APP

A fim de testar um efeito positivo na cognição por neutralização do epítopo de globulômero de Aβ(1-42) interno com anticorpo 8F5, um experimento de imunização passivo com camundongos transgênicos de APP foi realizado no qual os camundongos foram testados quanto a sua capacidade de lembrar objetos que eles já haviam investigado anteriormente. Após algum tempo, o retardo entre o primeiro e o segundo encontro dos objetos, os camundongos transgênicos APP não foram capazes de reconhecer o objeto já investigado. Esse experimento se baseia na curiosidade natural dos animais e uma falta significativa de interesse no objeto já investigado demonstra o reconhecimento do objeto.

EXEMPLO V.1: ÍNDICE DE RECONHECIMENTO AUMENTADO PELO ANTICORPO MONOCLONAL 8F5:

Animais:

Camundongos fêmea de um modelo de camundongo transgênico simples da Doença de Alzheimer em histórico FVB x C57Bl (APP/L, ReMYND, Leuven, Bélgica) e ninhadas negativas como controles do tipo selvagem em histórico FVB x C57Bl com idade de 3 meses foram empregados. Todos os camundongos foram genotipados por reação da cadeia da polimerase (PCR) na idade de três semanas e receberam um número de identidade único, uma vez que os resultados da PCR foram conhecidos e foram verificados duplamente por uma segunda PCR antes do início do estudo. Todos os camundongos foram aleatorizados e combinados por idade, isto é, eles receberam um número alea-

tório por computador e foram alocados aleatoriamente a um tratamento. Os animais foram engaiolados por grupo de tratamento 18 dias antes do início do estudo, a fim de permitir que os mesmos se familiarizassem com o novo contexto da gaiola. Os camundongos tiveram livre acesso à água estéril e pré-filtrada (lâmpada UV) e ração ara camundongos padrão. O alimento foi armazenado em condições secas e frias em um compartimento de armazenamento bem ventilado. A quantidade de água e comida era verificada diariamente, fornecida quando necessário e renovada duas vezes por semana. Os camundongos foram alojados em um ritmo de dia-noite invertido: 14 horas de luz/10 horas de escuridão iniciando às 7 horas da manhã em gaiolas de metal padrão tipo RVS T2 (área de 540 cm^2). As gaiolas foram equipadas com pisos sólidos e uma camada de forragem. O número de camundongos por gaiola foi limitado de acordo com a legislação que cuida dos animais. Cinco dias antes do início do teste de comportamento, os camundongos foram passados para duas gaiolas do tipo Macrolon e transportados para o laboratório a fim de se adaptarem ao ambiente do laboratório na preparação para o teste de comportamento.

Tratamento (Imunização Passiva)

Três experimentos individuais foram realizados, nos quais os camundongos (pelo menos 9 por grupo) receberam injeções intraperitoneais (500 μg em 240 μL/camundongo) nos dias 1, 8 e 15. Os camundongos fora tratados com anticorpos monoclonais 6G1, 8F5 e outros anticorpos não revelados, todos dissolvidos em salmoura tamponada com fosfato ou com 320

µL de salmoura tamponada com fosfato.

Novo Teste de Reconhecimento de Objeto

O novo teste de reconhecimento de objeto foi realizado no dia do terceiro tratamento. O protocolo empregado seguiu o método conforme descrito por Dewachter e outros (Journal of Neuroscience, 2002, 22(9):3445-3453). Os camundongos foram familiarizados por uma hora a uma caixa de campo aberto de Plexiglas (52 x 52 x 40 cm) com paredes verticais pretas e um isso translúcido, vagamente iluminado por uma lâmpada colocada abaixo da caixa. No dia seguinte, os animais foram colocados na mesma caixa e submetidos a um experimento de aquisição de 10 minutos. Durante esse experimento, os camundongos foram colocados individualmente no campo aberto, na presença de 2 objetos idênticos A (cilindro laranja ou cubo cinza, tamanho semelhante de ± 4 cm) e a duração ($tempo_{AA}$) e freqüência ($Freq_{AA}$) a exploração do objeto A (quando o focinho dos animais estava direcionado para o objeto a uma distância de < 1 cm e os camundongos foram ativamente na direção do objeto) sendo registrada por um sistema computadorizado (Ethovision, Noldus information Technology, Wageningen, Países-Baixos). Durante um tempo de retenção de dez minutos de experimento (segundo experimento) realizado duas hora e meia mais tarde, um novo objeto (objeto B, cubo cinza ou cilindro laranja) foi colocado em conjunto com o objeto familiar (objeto A) no campo aberto ($Freq_A$ e $Freq_B$ e $Tempo_A$ e $Tempo_B$, respectivamente). O índice de reconhecimento (RI) definido como a razão de duração na qual o novo objeto foi explorado em relação à duração no qual ambos

os objetos foram explorados ($Tempo_B/(Tempo_A + Tempo_B) \times 100$] foi usado para medir a memória não espacial. A duração e freqüência com as quais o objeto A foi explorado durante o experimento de aquisição ($tempo_{AA}$ e $Freq_{AA}$) foi usado para medir a curiosidade.

A análise dos dados foi realizada por combinação dos camundongos transgênicos APP que receberam anticorpos monoclonais 6G1 ou 8F5 ou salmoura tamponada com fosfato e ninhadas não transgênicas que receberam salmoura tamponada com fosfato, de todos três estudos (figura 4). Os camundongos que não distinguiram entre um objeto velho e um objeto novo tiveram um índice de reconhecimento de 50. Os camundongos que reconheceram o objeto antigo preferivelmente explorarão o novo objeto e consequentemente o índice de reconhecimento se torna superior a 50. Os camundongos que exploram exclusivamente o novo objeto possuem um índice de reconhecimento de 100. O índice de reconhecimento médio por grupo foi comparado contra o nível de chance, isto é, 50, por teste t. O índice de reconhecimento médio para todos os grupos foi também comparado por ANOVA seguido por um teste t pós-hoc. A diferença entre PBS e os grupos do tipo selvagem indicou um déficit cognitivo dos camundongos transgênicos APP nesse paradigma. Os camundongos que receberam injeção de PBS tiveram desempenho em nível de chance (isto é, não significativamente diferente de 50), enquanto todos os outros camundongos mostraram reconhecimento do objeto mostrado (Figura 4: estrelas). Quando o desempenho dos camundongos APP tratados com anticorpo foi comparado aos grupos de controle, foi ob-

servada uma diferença significativa versus camundongos tratados com PBS porém não versus camundongos do tipo selvagem (figura 4: círculos) indicando que o tratamento com anticorpo reverteu o déficit cognitivo nesses camundongos transgênicos APP.

EXEMPLO VI

ANÁLISE *IN SITU* DA REAÇÃO ESPECÍFICA DOS ANTICORPOS 8F5 E 8C5 AO PEPTÍDEO FIBRILAR AMILÓIDE BETA NA FORMA DE PLACAS AMILÓIDES E AMILÓIDE NOS VASOS NENINGEAIS EM CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS APP VELHOS E PACIENETS COM DOENÇA DE ALZHEIMER

Os anticorpos 8F5 e 8C5 mostraram coloração reduzida em relação aos depósitos de peptídeo fibrilar Aβ sugerindo que seu efeito terapêutico é mediado por ligação às formas globuloméricas solúveis ao invés das formas depositadas fibrilares do peptídeo Aβ. Uma vez que a ligação do anticorpo ao peptídeo fibrilar Aβ pode conduzir à rápida dissolução dos agregados e um aumento subsequente da concentração de Aβ solúvel, que por sua vez se acredita ser neurotóxico e podendo levar à micro hemorragias, é preferida uma terapia de anticorpos que afete o globulômero solúvel ao invés do monômero.

Métodos:

Para esses experimentos, várias amostras de material cerebral foram empregadas: tecido cortical de 1 pacientes com AD (RX16 e RZ 55) e tecido cortical de camundongos Tg2576 de 19 meses de idade (APPSWE # 001349, Taconic, Hudson, NY, USA) ou camundongos APP/L com 12 meses de idade

(ReMYND, Leuven, Bélgica). Os camundongos superexpressam APP humano com uma mutação de doença de Alzheimer familiar e formam depósitos de amilóide β no parenquima cerebral em camundongos com cerca de 11 meses de idade e depósitos de amilóide β nos vasos cerebrais maiores em camundongos com cerca de 18 meses de idade. Os animais foram anestesiados profundamente e receberam perfusão transcardíaca com 0,1 M de salmoura tamponada em fósfato (PBS) para fluxar o sangue. Então o cérebro foi removido do crânio e dividido longitudinalmente. Um hemisfério do cérebro foi congelado por choque e o outro fixado por imersão em aldeído parafórmico a 4%. O hemisfério fixado em imersão foi crioprotegido por enxágüe em sacarose a 30% em PBS e montado em um microtomo de congelamento. Todo o prosencéfalo foi cortado em seções transversais de 40 µm que foram coletadas em PBS e empregadas para procedimento de coloração subsequente. As amostras de neocórtex dos pacientes com doença de Alzheimer foram obtidos da Brain-Net, Munich, Alemanha como tecido congelado, fixado em imersão em aldeído parafórmico a 4% durante descongelamento e subseqüentemente tratados da mesma forma que o tecido do camundongo.

Seções individuais foram coloridas com Vermelho Congo usando o protocolo que se segue:

Material:

- Kit de corante Vermelho Congo para amilóide (Sigma-Aldrich; HT-60), consistindo em solução alcoólica de NaCl, solução de NaOH e solução de Vermelho Congo

- cuvetas para coloração

- lâminas para microscópio SuperfrostPlus e coberturas

- Etanol, xilol, meio de embebimento

Reagentes:

- NaOH diluído 1:100 com solução de NaCl rende salmoura alcalina

- salmoura alcalina diluída 1:100 com solução de Vermelho Congo rende solução alcalina de Vermelho Congo (preparar não mais de 15 minutos antes do uso, filtrado)

- monte seções sobre a lâmina e deixe que sequem

- incube a lâmina na cuveta de coloração, primeiro por 30-40 minutos em solução alcalina, então por 30-40 minutos em solução alcalina de Vermelho Congo

- enxágüe três vezes com etanol fresco e embeba em xilol

A coloração foi fotografada primeiro usando um microscópio Zeiss Axioplan (Zeiss, Jena, Alemanha) e avaliada quantitativamente. A cor vermelha indicou depósitos de amilóide ambos na forma de placas e nos vasos meningeais maiores. Mais tarde, a avaliação da coloração do anticorpo foi focada em três estruturas.

A coloração foi realizada por incubação das seções com uma solução contendo 0,7 - 0,7 µg/mL do respectivo anticorpo de acordo com o protocolo que se segue:

Materiais:

- Solução de enxágüe TBST (Salmoura Tamponada Tris com Tween 20; 10 x concentrada; DakoCytomation S3306, DAKO, Hamburg, Alemanha) 1:10 em água bidestilada)

- H_2O_2 a 0,3% em metanol

- soro de asno (Serotec, Düsseldorf, Alemanha), 5% em TBST, como soro de bloqueio

- anticorpos monoclonais de camundongo antiglobulômero diluídos em concentrações dadas de TBST

- anticorpo secundário: anticorpo anticamundongo de asno biotinilado (Jackson Immuno/Dianova, Hamburg, Alemanha; 715-065-150; diluído a 1:500 em TBST)

- StreptABComplex (DakoCytomation K 0377, DAKO, Hamburg, Alemanha)

- Kit de substrato de peroxidase diaminobenzidina (=DAB; SK-4100; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)

- Lâminas de microscópio SuperFrost Plus e revestimentos

- meio de embebimento isento de xilol (Medite, Burgdorf, Alemanha; X-tra Kitt)

Procedimento:

- transfira as seções de flutuamento para H_2O_2 a 0,3% resfriado em gelo e incube por 30 minutos

- lave por 5 minutos em tampão TBST

- incube com soro de asno/TBST por 20 minutos

- incube com anticorpo primário por 24 horas a temperatura ambiente

- lave em tampão TBST por 5 minutos

- incube com soro de bloqueio por 20 minutos

- lave em tampão TBST por 5 minutos

- incube com anticorpo secundário por 60 minutos a temperatura ambiente

- lave em tampão TBST por 5 minutos

- incube com StreptABComplex por 60 minutos a temperatura ambiente

- lave em tampão TBST por 5 minutos

- incube com DAB por 20 minutos

- monte a seção nas lâminas, lâminas secas ao ar, desidrate as lâminas com álcool e embeba as lâminas

Além do aspecto visual das seções sob o microscópio, a coloração do amilóide foi adicionalmente quantificada por corte óptico de 10 placas selecionadas aleatoriamente das imagens histológicas usando o sistema de análise de imagem ImagePro 5.0 e determinando seu valor médio em escala de cinza. Os valores de densidade óptica (foram calculados dos valores em escala de cinza por subtração da densidade básica média do material colorido a partir da densidade das placas de amilóide (0% - nenhuma coloração de placa acima do básico circundante, 100% - nenhuma transmissão/coloração máxima). As diferenças entre os anticorpos 6E10/4G8 e 6G1, 8C5 e 8F5, respectivamente, foram testadas quanto ao significado estatístico com ANOVA.

Resultados:

Todo o material colorido de anticorpo descrito provou se constituir em depósitos amilóides congofílicos (figura 7(A)). Os anticorpos 8F5 e 8C5, em preferência ao globulômero, coloriram depósitos parenquimais e congofílicos meningeanos de peptídeo Aβ significativamente menos em relação aos anticorpos 6G1 e 6E10 (figuras 7(B)-(C), (H). A análise quantitativa da coloração da placa amilóide parenquimal

revelou ligação de todos os anticorpos às placas (densidade estatisticamente significativa acima do controle), porém a ligação dos anticorpos 8F5 e 8C5 foi significativamente inferior em relação à ligação do anticorpo de referência 6E10 (elevado para seqüência de N-terminal de Aβ) e igual ou inferior ao anticorpo de referência 4G8 (elevado para seqüência N-terminal de Aβ) (figura 7(D)-figura (G)). Os anticorpos 8F5 e 8C5 se ligam menos aos depósitos de amilóide que aos anticorpos que reconhecem o monômero Aβ ou parte da seqüência Aβ. O tratamento com anticorpos se ligando ao peptídeo Aβ fibrilar pode conduzir à dissolução rápida das placas amilóides no tecido cerebral e um aumento subsequente da concentração de Aβ solúvel, o que por sua vez acredita-se ser neurotóxico podendo levar a micro hemorragia e/ou uma dissolução rápida do amilóide vascular, o que também levaria às micro hemorragias. Portanto, é preferida uma terapia com anticorpos que afete o globulômero solúvel ao invés do monômero.

Listagem de Seqüência

<110> Abbott Laboratories

<120> "Anticorpos Monoclonais e Usos dos Mesmos"

<130> 8127.WO.01

<140> PCT/US2006/046148
<141> 26-11-2006

<160> 20

<170> PatentIn versão 3.4

<210> 1
<211> 336
<212> DNA
<213> Murino

<400> 1
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact 120

ccagacaaga ggctggaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat 180

ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240

ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagtggtgac 300

tactggggcc aaggctccac tctcacagtc tcctca 336

<210> 2
<211> 339
<212> DNA
<213> Murino

<400> 2
gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta tttacattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acaaagtttc caaccgattt 180

tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcct 300

tggacgttcg gtggaggcac caagctagaa atcaaacgg 339

<210> 3
<211> 112
<212> PRT
<213> Murino

<400> 3

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

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

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

Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Thr Leu Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 4
<211> 113
<212> PRT
<213> **Murino**

<400> 4

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
20 25 30

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

Pro Lys 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 Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

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

Arg

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> **Murino**

<400> 5

Ser Tyr Gly Met Ser
1 5

<210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> Murino

<400> 6

Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 7
<211> 4
<212> PRT
<213> Murino

<400> 7

Ser Gly Asp Tyr
1

<210> 8
<211> 16
<212> PRT
<213> Murino

<400> 8

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> Murino

<400> 9

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Murino

<400> 10

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 11
<211> 336
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 11
gaggtgcagt tggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtacag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact 120

ccagacaaga ggctggagtt ggtcgcaagt attaaaaata atggtggtag cacctattat 180

ccagacagtt tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240

ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attattgtgc aagtggggat 300

tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc tcctca 336

<210> 12
<211> 339
<212> DNA
<213> Murino

<400> 12
gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gagccttgta cacagtaatg gagacacctt tttacattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acaaagtttc caaccgattt 180

tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggaatt tatttctgct ctcagagtat acatgttccg 300

tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacgg 339

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> Murino

<400> 13

Ser Tyr Gly Met Ser
1 5

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Ser Ile Lys Asn Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Leu Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 15
<211> 4
<212> PRT
<213> Murino

<400> 15

Ser Gly Asp Tyr
1

<210> 16
<211> 16
<212> PRT
<213> **Murino**

<400> 16

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asp Thr Phe Leu His
1 5 10 15

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> **Murino**

<400> 18

Ser Gln Ser Ile His Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 19
<211> 112
<212> PRT
<213> **Murino**

<400> 19

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

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

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

Ala Ser Ile Lys Asn Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 20
<211> 113
<212> PRT
<213> Murino

<400> 20

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

Pro Lys 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 Leu Gly Ile Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

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

Arg

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo isolado, **CARACTERIZADO** pelo fato de que se liga com especificidade maior a um globulômero da proteína amilóide beta (Aβ) em comparação a um monômero da proteína amilóide beta.

2. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito anticorpo é monoclonal.

3. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a razão de especificidade de ligação em relação ao dito globulômero e o dito monômero é de pelo menos 1,4.

4. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita razão é 1,4 a 16,9.

5. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito monômero de proteína amilóide beta é selecionado do grupo consistindo no monômero Aβ(1-42) e monômero Aβ (1-40).

6. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito anticorpo monoclonal é produzido por um hibridoma possuindo número de designação da American Type Culture Collection PTA-7238 ou PTA-7407.

7. Hibridoma, **CARACTERIZADO** pelo fato de que possui número de designação da American Type Culture Collection PTA-7238.

8. Anticorpo monoclonal (8F5), **CARACTERIZADO** pelo fato de que é produzido pelo dito hibridoma conforme definido na reivindicação 7.

9. Anticorpo monoclonal, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma cadeia pesada variável codificada pela SEQ ID NO:1.

10. Anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito anticorpo é humano ou humanizado.

11. Anticorpo monoclonal, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma cadeia leve variável codificada pela SEQ ID NO:2.

12. Anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito anticorpo é humano ou humanizado.

13. Anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende, adicionalmente, uma cadeia leve-pesada variável, codificada pela SEQ ID NO:1.

14. Anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito anticorpo é humano ou humanizado.

15. Anticorpo monoclonal, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende a SEQ ID NO:3.

16. Anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação 15, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito anticorpo é humano ou humanizado.

17. Anticorpo monoclonal, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende a SEQ ID NO:4.

18. Anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação 17, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito anticorpo é humano ou humanizado.

19. Anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação 17, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende, adicionalmente a SEQ ID NO:3.

20. Anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito anticorpo é humano ou humanizado.

21. Anticorpo isolado, **CARACTERIZADO** pelo fato de que se liga com especificidade maior a um globulômero da proteína amilóide beta em comparação a uma fibrila da proteína amilóide beta.

22. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito anticorpo é monoclonal.

23. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 23, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito anticorpo monoclonal é produzido por um hibridoma possuindo número de designação da American Type Culture Collection PTA-7238 ou PTA-7407.

24. Hibridoma, **CARACTERIZADO** pelo fato de que possui número de designação da American Type Culture Collection PTA-7407.

25. Anticorpo monoclonal (8C5), **CARACTERIZADO** pelo fato de que é produzido pelo dito hibridoma conforme definido na reivindicação 24.

26. Anticorpo monoclonal, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma cadeia pesada variável codificada pela SEQ ID NO:11.

27. Anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação 26, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito anticorpo é humano ou humanizado.

28. Anticorpo monoclonal, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma cadeia leve variável codificada pela SEQ ID NO:12.

29. Anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação 28, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito anticorpo é humano ou humanizado.

30. Anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação 28, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende, adicionalmente, uma cadeia leve variável codificada pela SEQ ID NO:11.

31. Anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação 30, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito anticorpo é humano ou humanizado.

32. Anticorpo monoclonal, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende a SEQ ID NO:19.

33. Anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação 32, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito anticorpo é humano ou humanizado.

34. Anticorpo monoclonal, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende a SEQ ID NO:20.

35. Anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação 34, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito anticorpo é humano ou humanizado.

36. Anticorpo monoclonal, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma cadeia pesada variável, onde a dita cadeia pesada variável compreende pelo menos uma região de determinação de complementaridade (CDR) selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14 e SEQ ID NO:15.

37. Anticorpo monoclonal, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma cadeia leve variável, onde a dita cadeia leve variável compreende pelo menos uma CDR selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 e SEQ ID NO:18.

38. Anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação 37, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende, adicionalmente, uma cadeia pesada variável, onde a dita cadeia pesada variável compreende pelo menos uma CDR selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14 e SEQ ID NO:15.

39. Anticorpo monoclonal, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma cadeia pesada variável, onde a dita cadeia pesada variável compreende pelo menos uma região de determinação de complementaridade (CDR) selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 e SEQ ID NO:7.

40. Anticorpo monoclonal, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma cadeia leve variável, onde a dita ca-

deia leve variável compreende pelo menos uma CDR selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 e SEQ ID NO:10.

41. Anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação 40, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende, adicionalmente, uma cadeia pesada variável, onde a dita cadeia pesada variável compreende pelo menos uma CDR selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 e SEQ ID NO:7.

42. Uso do dito anticorpo isolado, conforme definido nas reivindicações 1 ou 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser no preparo de um medicamento para tratamento ou prevenção da Doença de Alzheimer para ser administrado a um paciente que necessite do dito tratamento ou prevenção.

43. Uso, de acordo com a reivindicação 42, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a administração é feita através de uma via selecionada do grupo consistindo em administração intramuscular, administração intravenosa e administração subcutânea.

44. Método in vitro para diagnóstico da Doença de Alzheimer em um paciente com suspeita dessa doença, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende as etapas de:

a. isolamento de uma amostra biológica do dito paciente;

b. contato da dita amostra biológica com o dito anticorpo isolado, conforme definido nas reivindicações 1 ou 6, por um período de tempo e sob condições suficientes para formação dos complexos de antígeno/anticorpo; e

c. detecção da presença dos ditos complexos de antígeno/anticorpo na dita amostra, a presença dos ditos complexos indicando um diagnóstico da Doença de Alzheimer no dito paciente.

45. Método, de acordo com a reivindicação 44, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito antígeno é um globulômero.

46. Método in vitro para diagnosticar a Doença de Alzheimer em um paciente com suspeita da doença, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende as etapas de:

a. isolamento de uma amostra biológica do dito paciente;

b. contato da dita amostra biológica com um antígeno, por um período de tempo e sob condições suficientes, para a formação dos complexos de anticorpo/antígeno;

c. adição de um conjugado aos complexos de anticorpo/antígeno resultantes, por um período de tempo e sob condições suficientes, de modo a permitir que o dito conjugado se ligue ao anticorpo ligado, onde o dito conjugado compreende o dito anticorpo isolado, conforme definido nas reivindicações 1 ou 6, anexado a um composto de geração de sinal capaz de gerar de um sinal detectável; e

d. detecção da presença de um anticorpo que pode estar presente na dita amostra biológica, por detecção de um sinal gerado pelo dito composto de geração de sinal, o dito sinal indicando um diagnóstico da Doença de Alzheimer no dito paciente.

47. Método, de acordo com a reivindicação 46, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito antígeno é um globulômero.

48. Método in vitro para diagnosticar a Doença de Alzheimer em um paciente com suspeita da Doença de Alzheimer, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende as etapas de:

a. isolamento de uma amostra biológica do dito paciente;

b. contato da dita amostra biológica com o anti-anticorpo, onde o dito anti-anticorpo é específico para o dito anticorpo, conforme definido nas reivindicações 1 ou 6, por um período de tempo e sob condições suficientes, de modo a permitir a formação dos complexos de anti-anticorpo/anticorpo, os ditos complexos contendo anticorpo presente na dita amostra biológica;

c. adição de um conjugado aos complexos de anti-anticorpo/anticorpo resultantes, por um período de tempo e sob condições suficientes, de modo a permitir que o conjugado se ligue ao anticorpo ligado, onde o dito conjugado compreende um antígeno que se liga a um composto de geração de sinal, capaz de gerar de um sinal detectável; e

d. detecção de um sinal gerado pelo dito composto de geração de sinal, dito sinal indicando um diagnóstico da Doença de Alzheimer no dito paciente.

49. Composição, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende o dito anticorpo isolado, conforme definido nas reivindicações 1 ou 6.

50. Uso da composição, conforme definida na reivindicação 49, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser no preparo de um medicamento para prevenir ou tratar Doença de Alzheimer.

51. Vacina, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende o dito anticorpo isolado, conforme definido nas reivindicações 1 ou 6, e um adjuvante farmaceuticamente aceitável.

52. Uso do anticorpo isolado, conforme definido nas reivindicaçãoes 1 ou 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser no preparo de uma vacina para prevenir ou tratar Doença de Alzheimer.

53. Método in vitro para identificação dos compostos apropriados para imunização ativa de um paciente com suspeita de desenvolver a Doença de Alzheimer, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende as etapas de:

a) exposição de um ou mais compostos de interesse ao dito anticorpo isolado, conforme definido nas reivindicações 1 ou 6, por um período de tempo e sob condições suficientes para que os ditos um ou mais compostos se liguem ao dito anticorpo isolado, conforme definido nas reivindicações 1 ou 6; e

b) identificação desses compostos que se ligam ao dito anticorpo isolado, conforme definido nas reivindicações 1 ou 6, os ditos compostos identificados para serem empregados na imunização ativa em um paciente predisposto ao desenvolvimento da Doença de Alzheimer.

54. Kit, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

a) o dito anticorpo isolado, conforme definido nas reivindicações 1 ou 6, e

b) um conjugado compreendendo um anticorpo anexado a um composto de geração de sinal, onde o dito anticorpo do dito conjugado é diferente do dito anticorpo isolado.

55. Kit, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

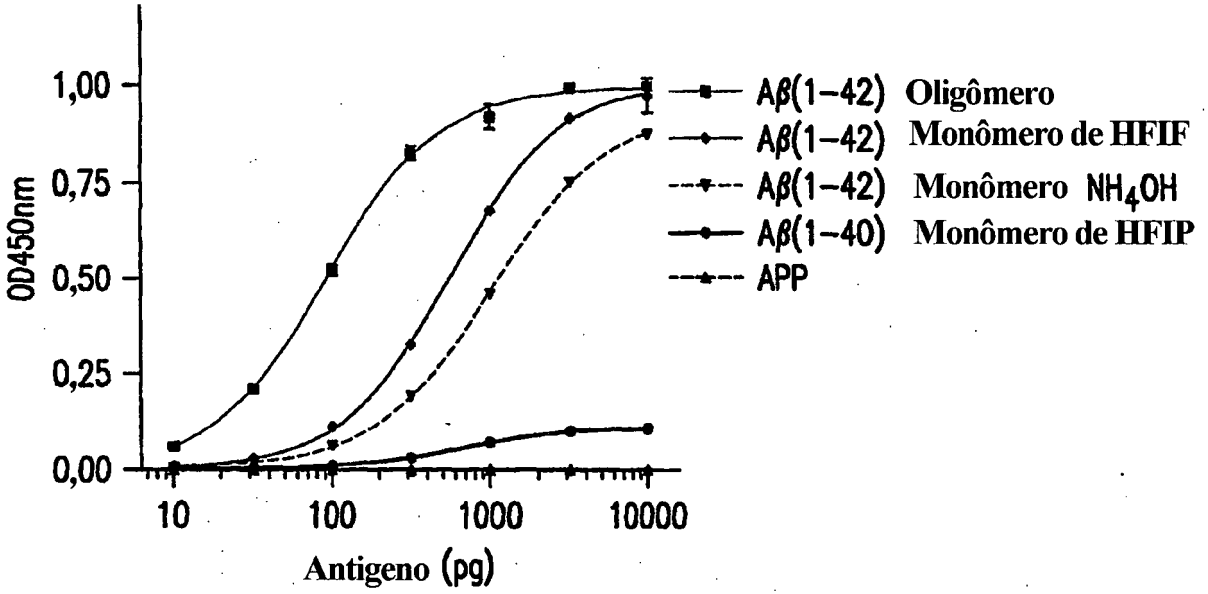
a) um anti-anticorpo para o dito anticorpo isolado, conforme definido nas reivindicações 1 ou 6, e

b) um conjugado compreendendo um antígeno anexado a um composto de geração de sinal.

56. Kit, de acordo com a reivindicação 55, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito antígeno é um globulômero.

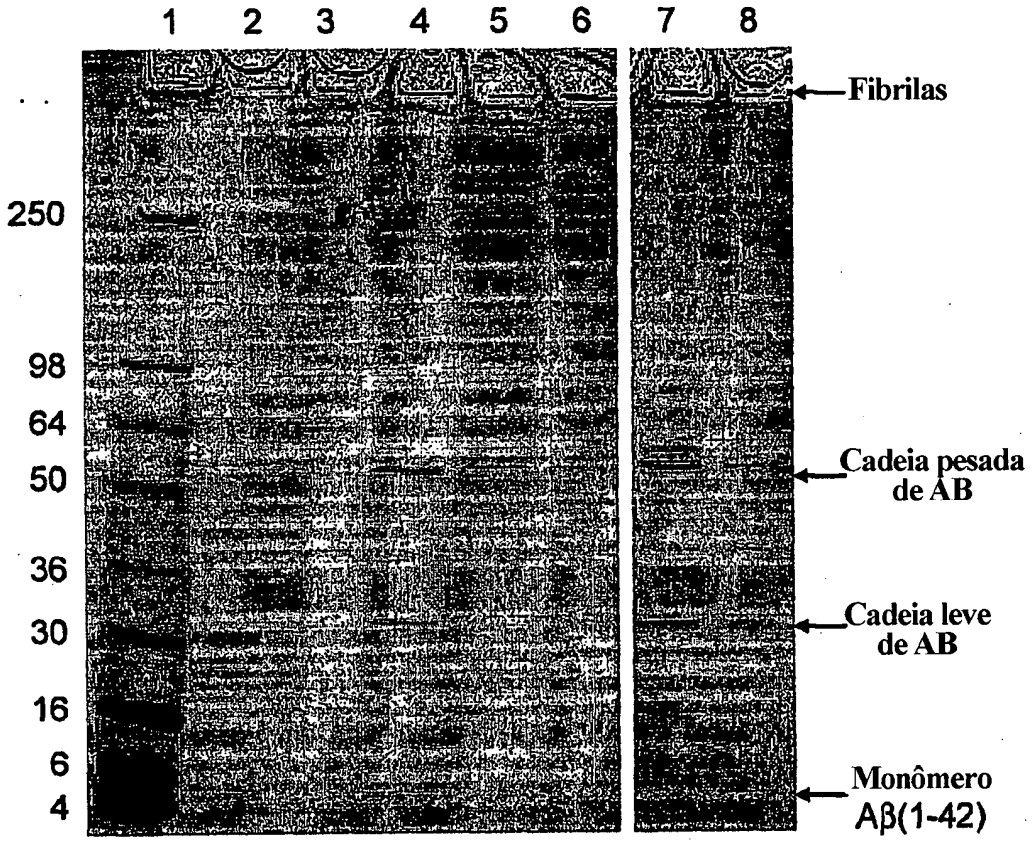
Elisa"Sandwich" de várias formas Aβ- com 8F5 de clone biotinilado - 6G1 de clone revestido

6G1 de clone anti-Aβ- revestido --> Formas-Aβ --> 8F5 de clone biotinilado --> Estreptavidina-POD --> Desenvolvimento



	Aβ(1-42) Oligômero	Aβ(1-42) Monômero HFIP	Aβ(1-42) Monômero NH_4OH	Aβ(1-40) Monômero HFIP
BASE	-0,001218	0,004304	0,006727	0,004288
TOPO	0,9926	1,002	0,9292	0,1116
LOGEC50	1,958	2,745	3,003	2,825
PONTO DE INFLEXÃO	1,215	1,270	1,204	1,375
EC50	90,74	555,8	1007	667,8

FIG.1



1. Marcador
2. Controle de preparação de fibrila
3. Preparação de fibrila; + mMAb 6E10 ; 20h 37°C ; Sobrenadante
4. Preparação de fibrila; + mMAb 6E10 ; 20h 37°C ; Microesfera
5. Preparação de fibrila; + mMAb 4G8 ; 20h 37°C ; Sobrenadante
6. Preparação de fibrila; + mMAb 4G8 ; 20h 37°C ; Microesfera
7. Preparação de fibrila; + mMAb 8F5 ; 20h 37°C ; Sobrenadante
8. Preparação de fibrila; + mMAb 8F5 ; 20h 37°C ; Microesfera

FIG.2

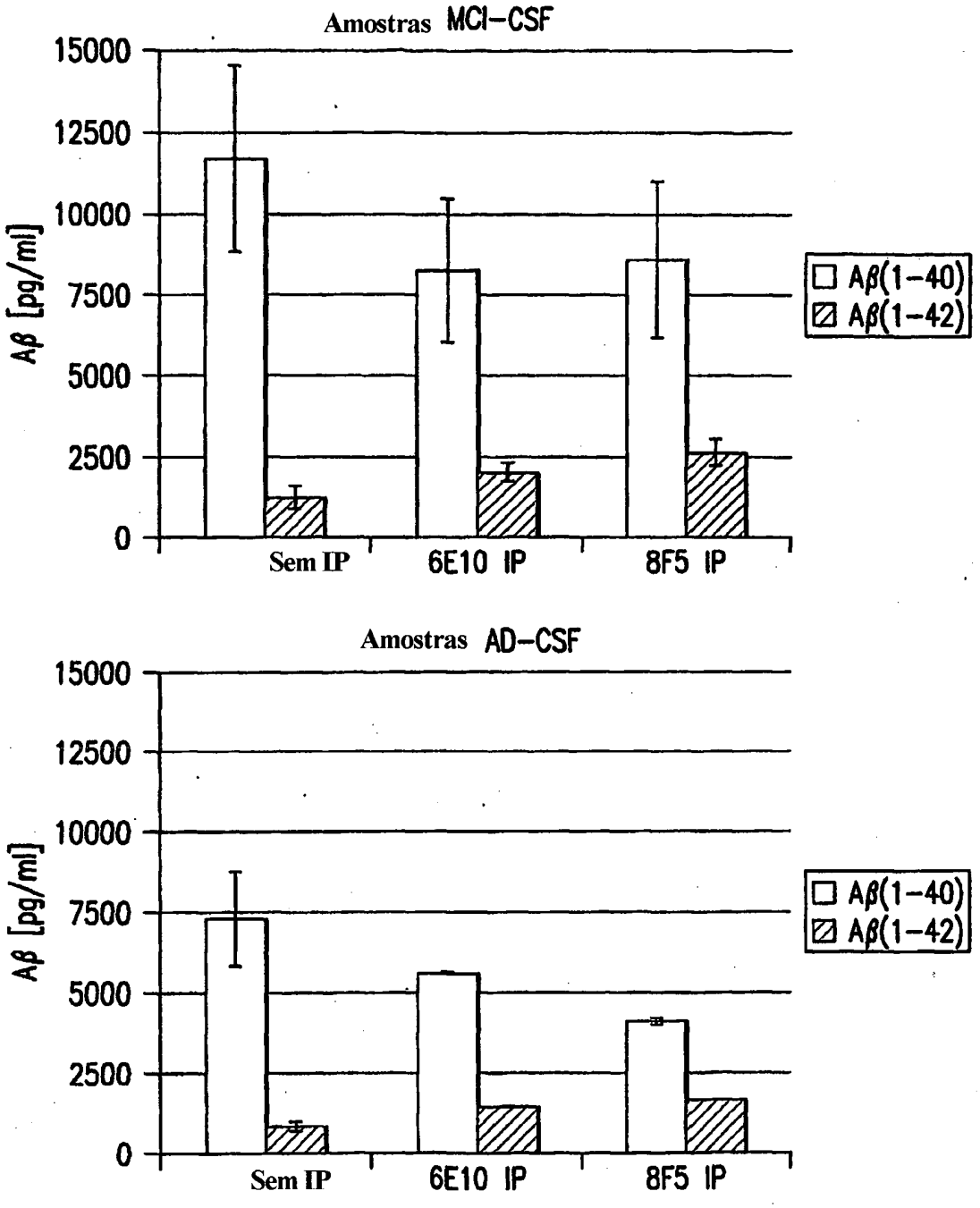
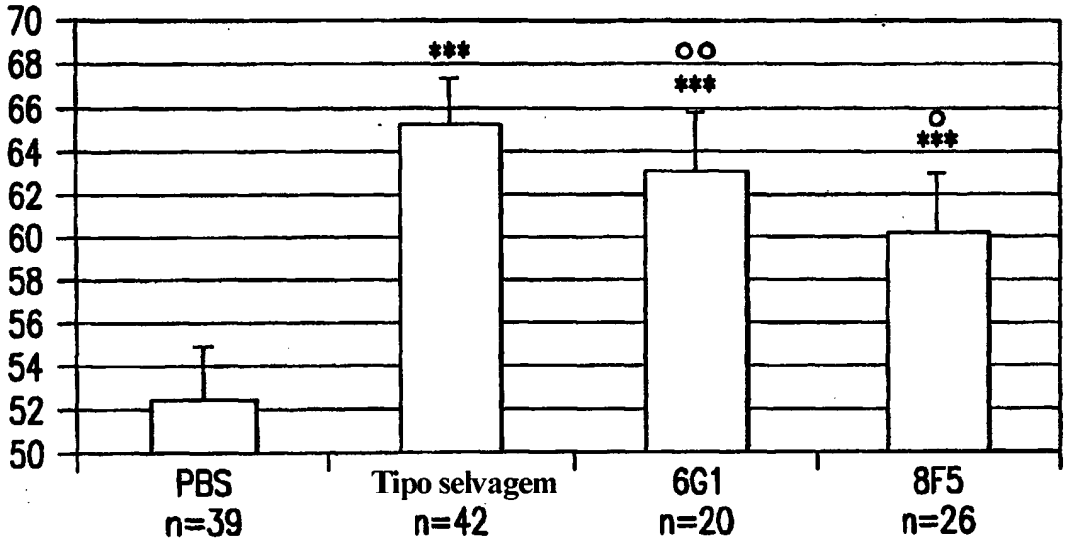

Amostras MCI-CSF
15000
12500
10000
7500
5000
2500
0
Aβ [pg/ml]
Sem IP
6E10 IP
8F5 IP
Aβ(1-40)
Aβ(1-42)
Amostras AD-CSF
15000
12500
10000
7500
5000
2500
0
Aβ [pg/ml]
Sem IP
6E10 IP
8F5 IP
Aβ(1-40)
Aβ(1-42)

FIG.3



*** $P<0.001$ vs. 50%
o $P<0.05$; oo $P<0.01$
Teste t pós hoc vs. após PBS $P<0,001$ em ANOVA

FIG.4

VH 8F5

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGCCC
TGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGGCATGTCT
TGGGTTCGCCAGACTCCAGACAAGAGGCTGGAATTGGTCGCAAGCATCAATA
GTAATGGTGGTAGCACCTATTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCGATTCACCAT
CTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAG
TCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGTGGTGACTACTGGGGCCAAG
GCTCCACTCTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO:1)

FIG.5A

VL 8F5

GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCA
AGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTATATAGTAATGGAGACA
CCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATC
TACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTG
GATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCT
GGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCTTGGACGTTCGGTGGAG
GCACCAAGCTAGAAATCAAACGG (SEQ ID NO:2)

FIG.5B

VH 8F5

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLELVASINSN
GGSTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCASGDYWGQGST
LTVSS (SEQ ID NO:3)

CDR1 (VH) = SYGMS (SEQ ID NO:5)
CDR2 (VH) = SINSNGGSTYYPDSVKG (SEQ ID NO:6)
CDR3 (VH) = SGDY (SEQ ID NO:7)

FIG.6A

VL 8F5

DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVYSNGDTYLHWYLQKPGQSPKLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLE
IKR (SEQ ID NO:4)

CDR1(VL) = RSSQSLVYSNGDTYLH (SEQ ID NO:8)
CDR2(VL) = KVSNRFS (SEQ ID NO:9)
CDR3(VL) = SQSTHVPWT (SEQ ID NO:10)

FIG.6B

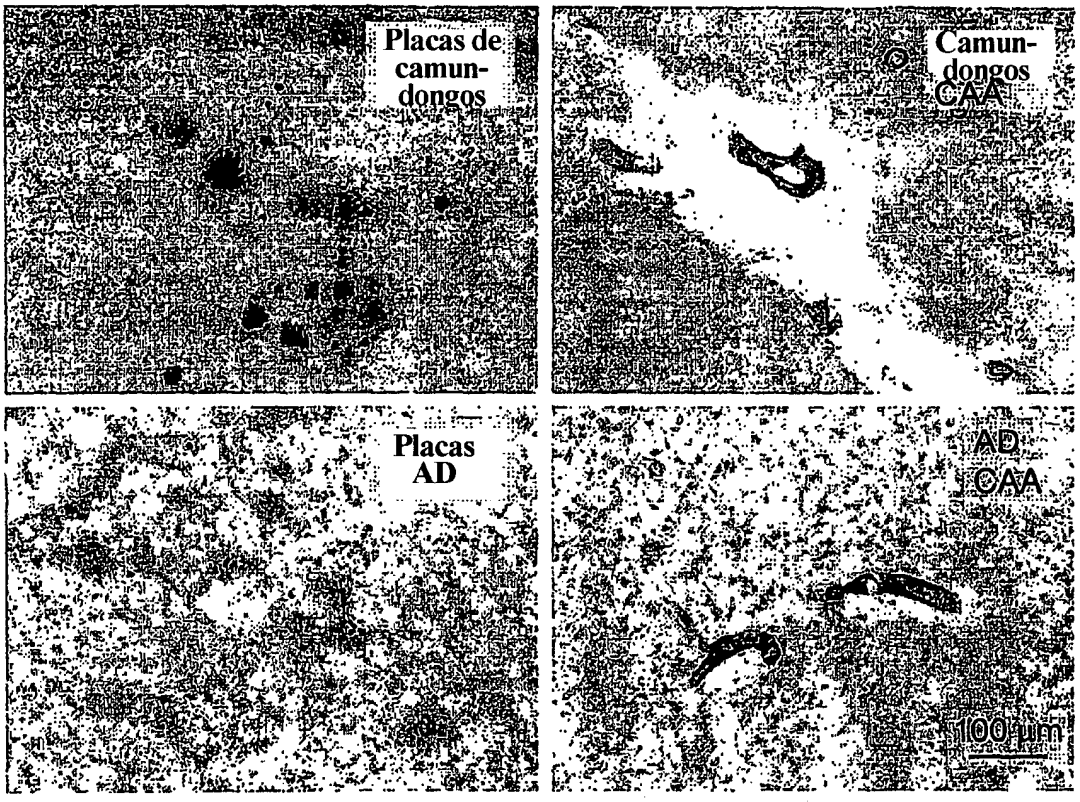

Placas de camun-dongos
Camun-dongos CAA
Placas AD
AD CAA
100 µm

FIG.7A

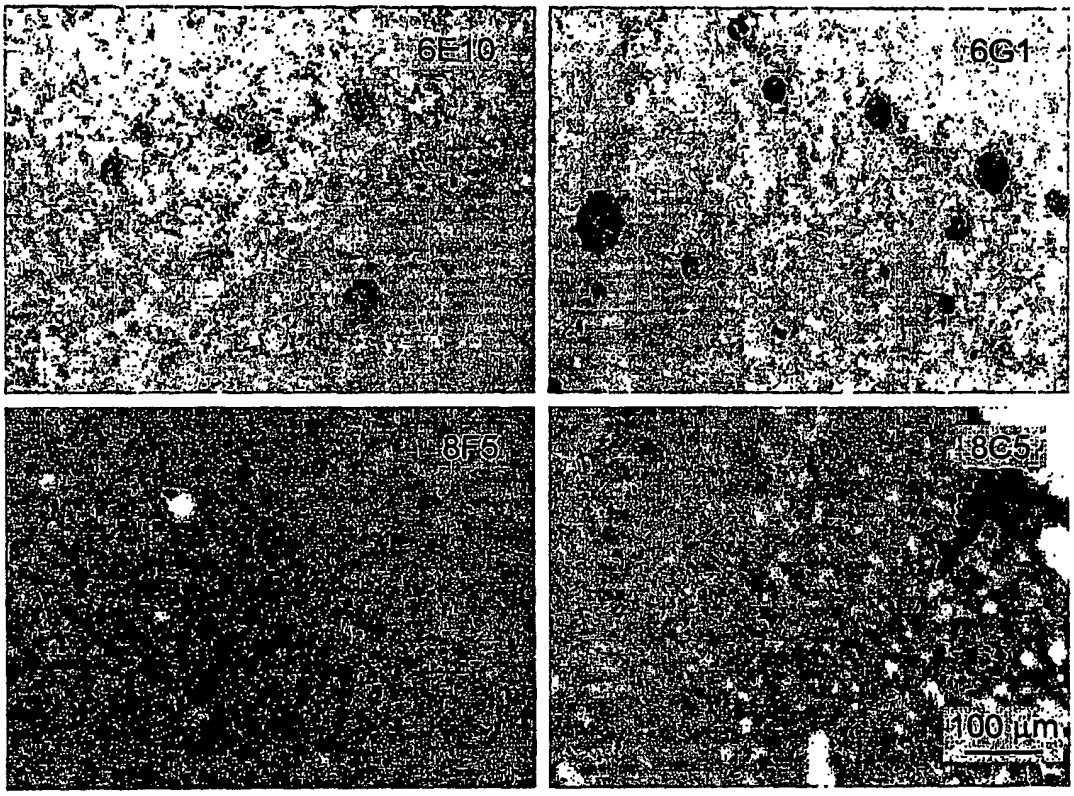


FIG.7B

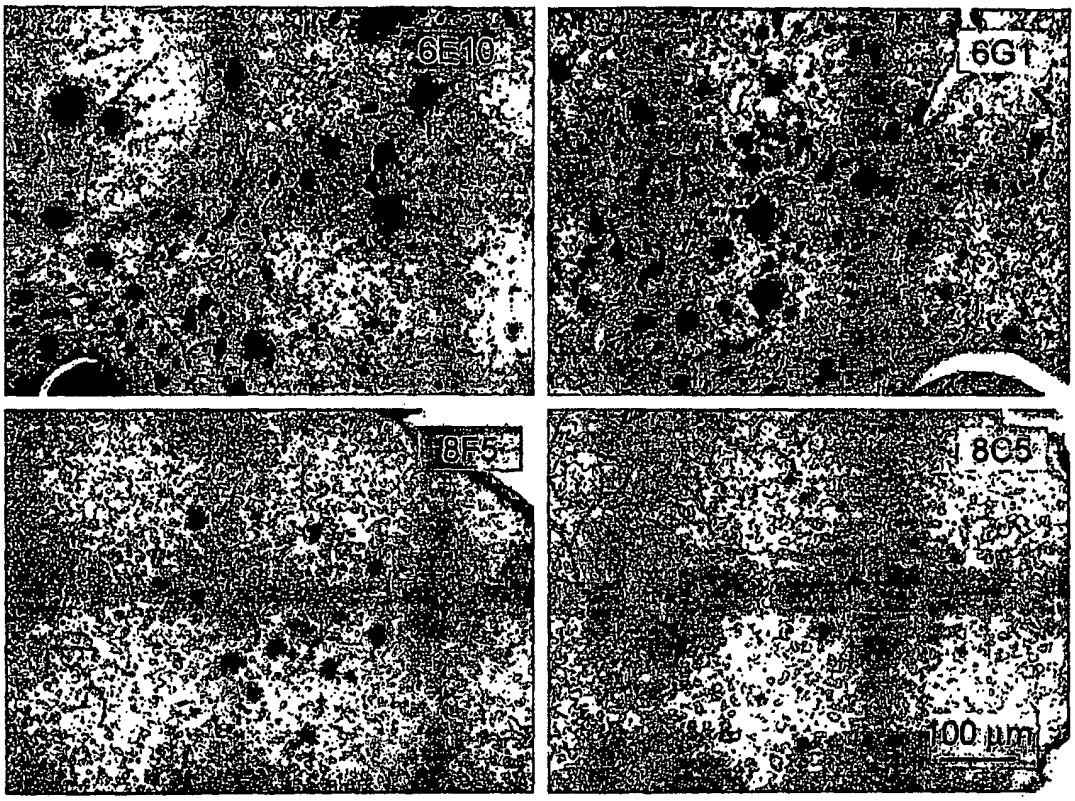


FIG.7C

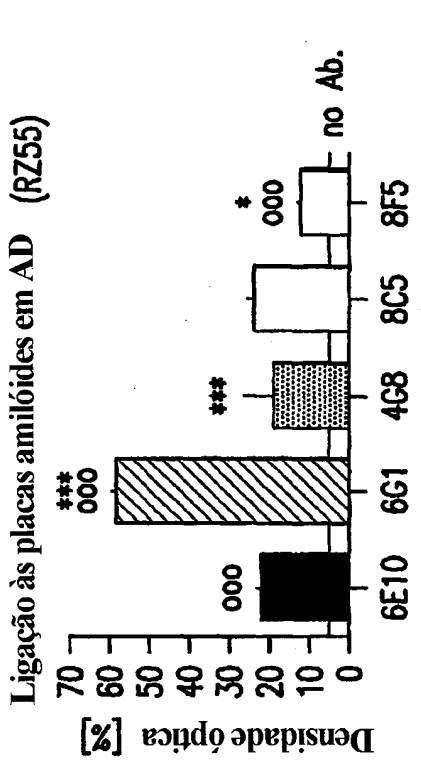


FIG.7F

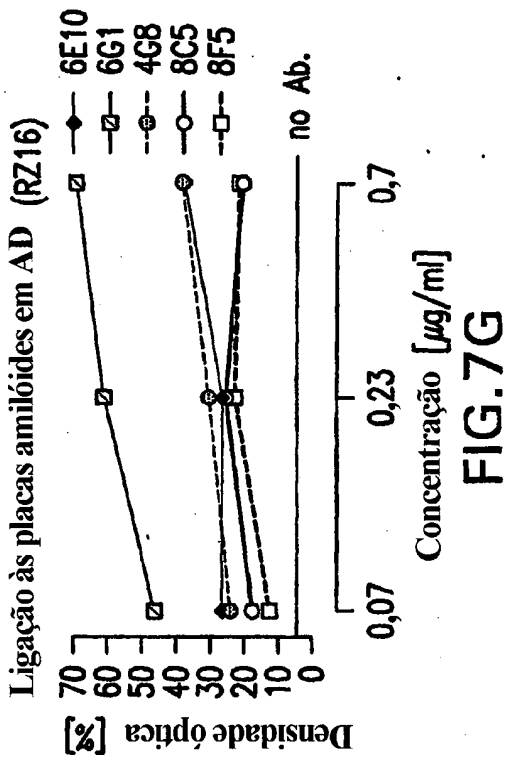


FIG.7G

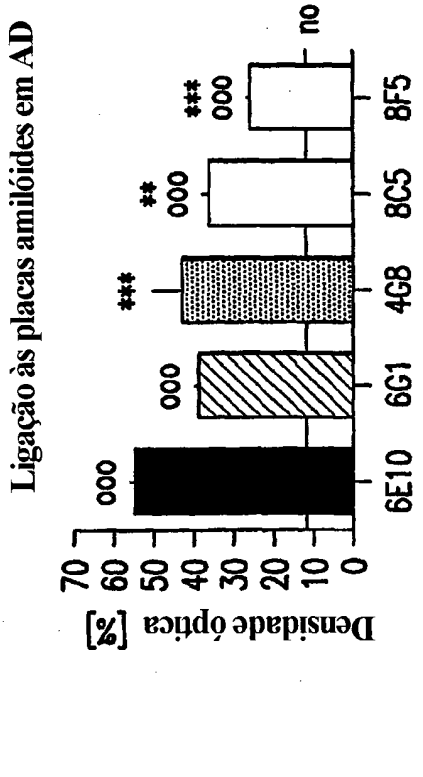


FIG.7D

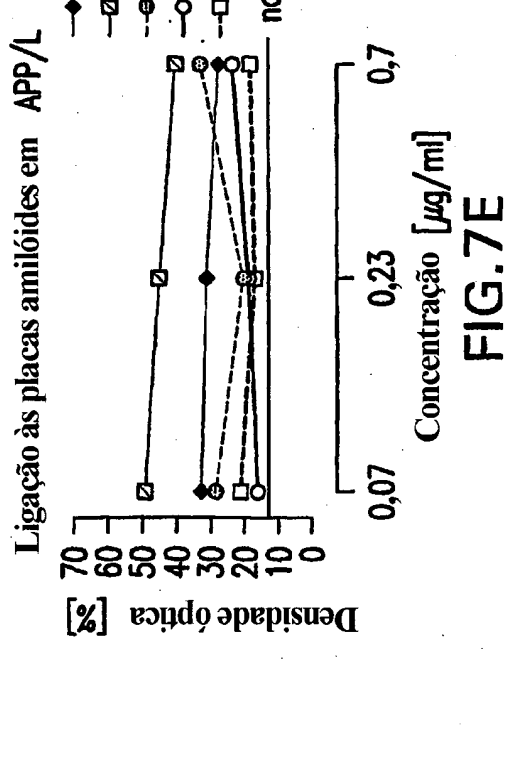


FIG.7E

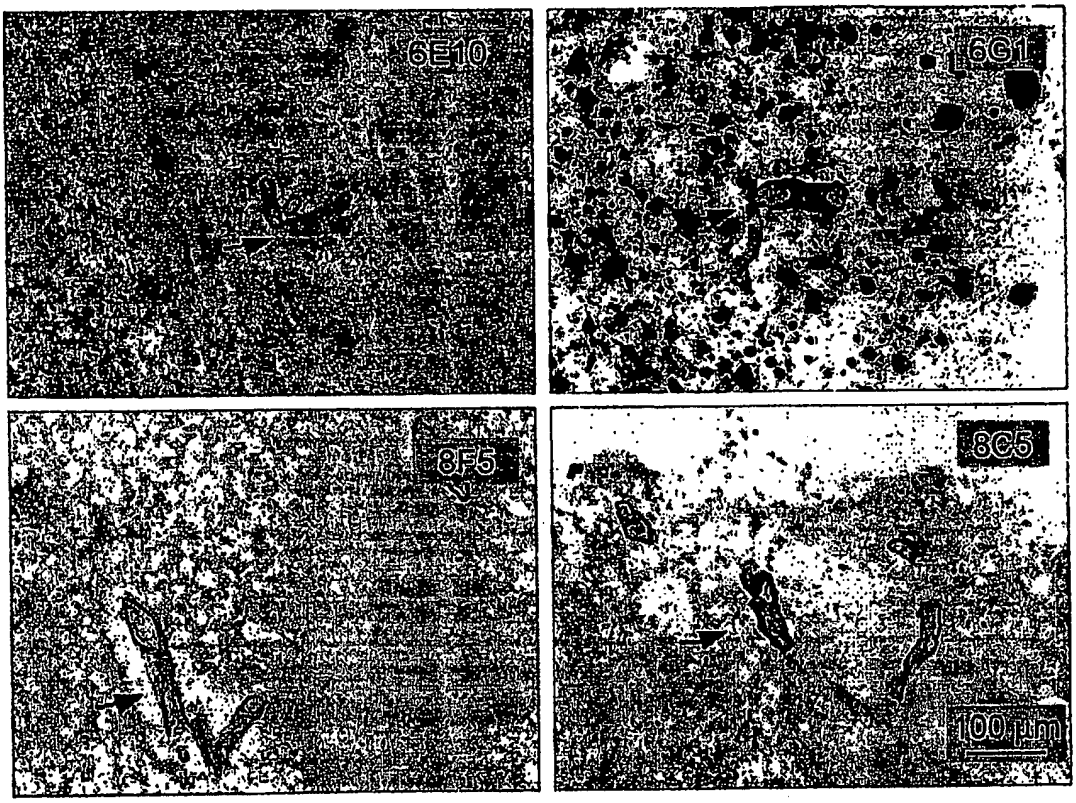
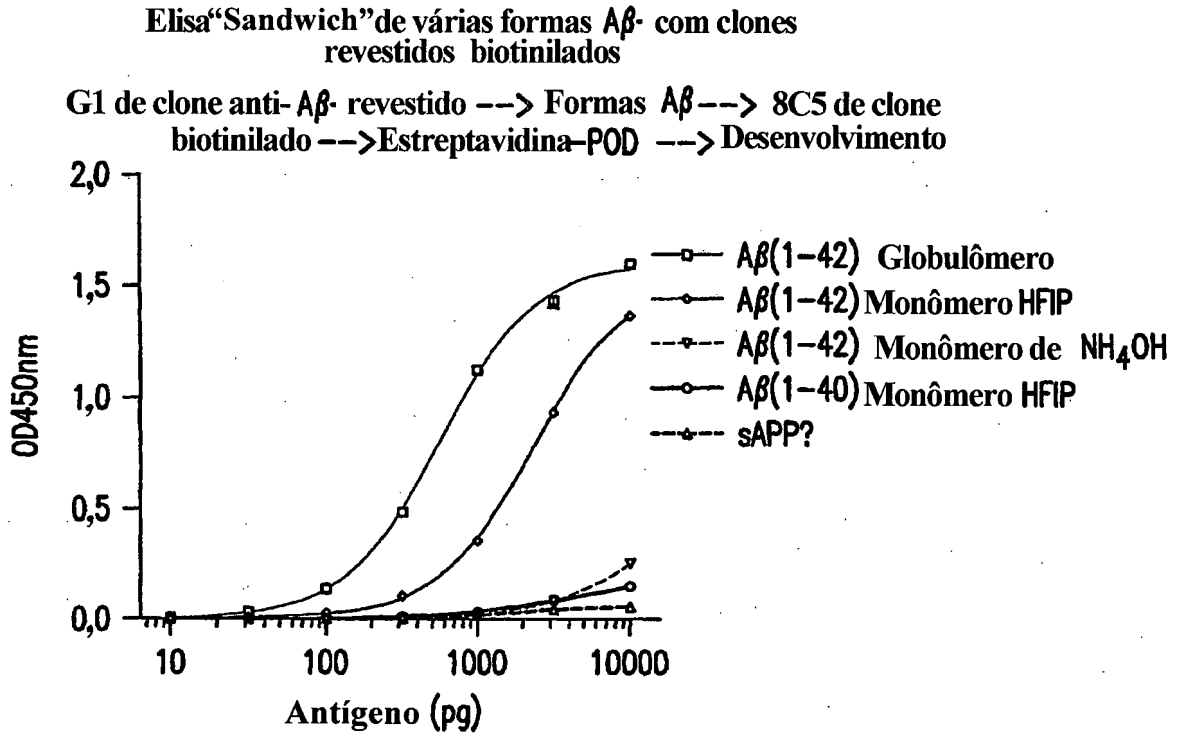


FIG.7H



	Aβ(1-42) Globulômero	Aβ(1-42) Monômero HFIP	Aβ(1-42) Monômero NH_4OH	Aβ(1-40) Monômero HFIP	sAPP?
BASE	0,0003317	0,005757	-0,008508	0,0002754	0,0003000
TOPO	1,601	1,545	1,137	0,2455	0,06415
LOGEC50	2,755	3,370	4,505	3,794	3,237
PONTO DE INFLEXÃO	1,369	1,377	1,052	0,9842	1,197
EC50	568,2	2346	31991	6222	1725

FIG.8

VH 8C5

GAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCC
TGAAACTCTCCTGTACAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGGCATGTCT
TGGGTTCGCCAGACTCCAGACAAGAGGCTGGAGTTGGTCGCAAGTATTAAAA
ATAATGGTGGTAGCACCTATTATCCAGACAGTTTGAAGGGCCGATTCACCAT
CTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAG
TCTGAGGACACAGCCATGTATTATTGTGCAAGTGGGGATTACTGGGGCCAAG
GCACCACTCTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO:11)

FIG.9A

VL 8C5

GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCA
AGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAGAC
ACCTTTTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGAT
CTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTG
GATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCT
GGGAATTTATTTCTGCTCTCAGAGTATACATGTTCCGTGGACGTTCGGTGGAG
GCACCAAGCTGGAAATCAAACGG (SEQ ID NO:12)

FIG.9B

VH 8C5

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCTASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLELVASIKNN
GGSTYYPDLSLKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCASGDYWGQGTT
LTVSS (SEQ ID NO:19)

CDR1 (VH) = SYGMS (SEQ ID NO:13)

CDR2 (VH) = SIKNNGGSTYYPDSLKG (SEQ ID NO:14)

CDR3 (VH) = SGDY (SEQ ID NO:15)

FIG.10A

VL 8C5

DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGDTFLHWYLQKPGQSPKLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYFCSQSIHVPWTFGGGTKLEI
KR (SEQ ID NO:20)

CDR1 (VL) = RSSQSLVHSNGDTFLH (SEQ ID NO:16)

CDR2 (VL) = KVSNRFS (SEQ ID NO:17)

CDR3 (VL) = SQSIHVPWT (SEQ ID NO:18)

FIG.10B

RESUMO

"ANTICORPOS MONOCLONAIS E USOS DOS MESMOS"

A presente invenção se refere aos anticorpos monoclonais (por exemplo, 8F5 e 8C5) que podem ser empregados, por exemplo, na prevenção, tratamento e diagnóstico da Doença de Alzheimer ou outros transtornos neurodegenerativos.