(11) Número de Publicação: **PT 1583774 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 14/47 (2007.10)

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

(22) Data de pedido: **2004.01.13**

(30) Prioridade(s): **2003.01.14 AT 362003**
2003.09.17 AT 14642003

(43) Data de publicação do pedido: **2005.10.12**

(45) Data e BPI da concessão: **2010.02.25**
066/2010

(73) Titular(es):
AFFIRIS AG
KARL-FARKAS-GASSE 22 1030 WIEN **AT**

(72) Inventor(es):
FRANK MATTNER **AT**

(74) Mandatário:
JOSÉ LUÍS FAZENDA ARNAUT DUARTE
RUA SOUSA MARTINS, Nº 10 1050-218 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **MÉTODOS PARA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE DOENÇA DE ALZHEIMER (DA)**

(57) Resumo:

RESUMO

"MÉTODOS PARA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE DOENÇA DE ALZHEIMER (DA)"

O invento refere-se à utilização de um composto compreendendo a seguinte sequência de aminoácidos $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$, em que X1 é um aminoácido, excepto C, X_2 é um aminoácido, excepto C, X_3 é um aminoácido, excepto C, X_4 é um aminoácido, excepto C, X_5 é um aminoácido, excepto C, X_6 é um aminoácido, excepto C, e em que $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ não é DAEFRH, possuindo o referido composto uma capacidade de ligação a um anticorpo que é específico para a sequência N-terminal natural de Aβ42 DAEFRH, e 5-meros deste possuindo uma capacidade de ligação ao referido anticorpo que é específico para a sequência N-terminal natural de Aβ42 DAEFRH, para a preparação de uma vacina para doença de Alzheimer.

DESCRIÇÃO

"MÉTODOS PARA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE DOENÇA DE ALZHEIMER (DA)"

O presente invento refere-se a métodos para prevenção e tratamento de doença de Alzheimer (DA).

O péptido β-amilóide (Aβ) tem um papel central na neuropatologia da doença de Alzheimer (DA) (Roher *et al.*, "β-amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: Implications for the pathology of Alzheimer disease" *PNAS* 90: 10836, 1993). As formas familiares da doença foram ligadas a mutações na proteína precursora amilóide (APP) e nos genes de presenilina. As mutações ligadas à doença nestes genes resultam em maior produção da forma de 42 aminoácidos do péptido (Aβ42), que é a forma predominante verificada nas placas amilóides da doença de Alzheimer. Um modelo animal para a doença está comercialmente disponível. O ratinho transgénico PDAPP, que sobreexpressa APP humana mutante (na qual o aminoácido na posição 717 é F em vez de V), desenvolve progressivamente muitas das características neuropatológicas da doença de Alzheimer de um modo dependente da idade e do cérebro (Games *et al.*, "Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β-amyioid precursor protein" *Nature* 373: 523, 1995).

Estudos de vacinação com uma vacina "normal", não baseada em mimotopos foram já efectuados. Animais transgénicos foram imunizados com Aβ42 agregado, antes do surgimento de neuropatologias do tipo DA (6 semanas) ou num estádio mais tardio (11 meses). A imunização de animais jovens preveniu o desenvolvimento da formação de placas, distrofia neurítica e astrogliose. O tratamento de animais mais velhos reduziu marcadamente as neuropatologias semelhantes a DA. Esta abordagem de vacinação experimental induziu o desenvolvimento de anticorpos contra Aβ42 capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica e ataca as placas amilóides (Schenk *et al.*, "Immunization with amyloid-β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse" *Nature* 400: 173, 1999). As placas são subsequentemente removidas através de vários mecanismos, incluindo fagocitose medida pelo receptor Fc (Bard *et al.*, "Peripherally administered antibodies against amyloid β-peptides enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease" *Nature Med.* 6: 916, 2000). Esta vacina foi também capaz de atrasar défices de memória (Janus *et al.*, "Aβ peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease" *Nature* 408: 979, 2000).

Uma terapia de imunização altamente promissora para DA tem estado em ensaios clínicos desde 1999. Presume-se que a imunização despoleta o sistema imunitário para atacar as placas e eliminar estes depósitos do cérebro

humano afectado, embora o mecanismo exacto subjacente necessite de ser caracterizado em mais detalhe.

Estes ensaios clínicos foram conduzidos pela companhia farmacêutica Elan em conjunto com a empresa sua parceira, American Home Products (vacina terapêutica AN-1792, QS21 como adjuvante). Os ensaios de fase I foram terminados com sucesso em 2000. Os ensaios de fase II foram iniciados no fim de 2001 para testar a eficácia num painel de pacientes com DA suave a moderada.

Agora estes ensaios de fase II foram permanentemente descontinuados devidos a neuroinflamação em vários pacientes (Editorial "Insoluble problem?" *Nature Med.* 8: 191, 2002). Os sintomas incluíram meningoencefalite asséptica levando a paragem imediata deste ensaios em todo o mundo. No pior cenário, mostrar-se-á que os pacientes afectados montaram uma resposta auto-imunitária - um risco inerente em muitas imunoterapias. As complicações auto-imunes podiam ter sido antecipadas dada a ubiquidade de APP, que como é claro possui determinantes antigénicos em comum com o seu produto proteolítico. Mais recentemente, estudos adicionais concentraram-se na natureza dos anticorpos induzidos por imunização com Aβ42 agregado (em humanos e ratinhos) revelando que a maioria dos anticorpos reconhece um pequeno domínio entre o aminoácido 4 e 10 de Aβ42 (Aβ4-10). Os anticorpos de ratinho foram capazes de bloquear fibrilogénese Aβ e destruir as fibras Aβ preexistentes (McLaurin *et al.*, "Therapeutically effective

antibodies against amyloid-β peptide target amyloid-β residues 4-10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis" *Nature Med.* 8: 1263, 2002). De nota, os anticorpos humanos não reagem com APP exposta à superfície de células ou qualquer outro produto proteolítico não agregado do precursor (Hock *et al.*, "Generation of antibodies specific for β-amyloid by vaccination of patients with Alzheimer disease" *Nature Med.* 8: 1270, 2002). Foi observada uma clara diferença entre os soros humano e de ratinho: em contraste com os anticorpos humanos, os anticorpos de ratinho detectam Aβ monomérico, oligomérico e fibrilar. Isto é importante e pode ser um pré-requisito para a potência terapêutica uma vez que se acumulam provas de que pequenos oligómeros de Aβ, que não são reconhecidos pelo anti-Aβ humano, são os principais intervenientes tóxicos na doença (Walsh *et al.*, "Naturally secreted oligomers of amyloid B protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo" *Nature* 416: 535, 2002). Assim, uma potencial nova estratégia é a imunização com uma vacina contendo os aminoácidos 4-10 do β-amilóide (em vez do Aβ42 agregado). Apesar da desconhecida eficácia esta estratégia pode também enfrentar problemas auto-imunes uma vez que os pacientes deverão ser directamente imunizados com um epitopo "próprio" (de células B lineares).

WO 00/72880A divulga a utilização de fragmentos N-terminais de Aβ42 numa vacina para a doença de Alzheimer.

WO 01/18169A2 divulga um método de imunização

contra doenças formadoras de placas utilizando tecnologias de apresentação.

Apesar destes desenvolvimentos desapontantes em estratégias recentes de vacinação de DA, uma vacina de Aβ é ainda considerada como o modo mais promissor para combater a DA. No entanto, há a necessidade urgente de melhorias e novas estratégias em vacinação de DA. Especialmente, uma tal vacina não deve induzir células T e/ou B auto-reactivas.

Por essa razão, o presente invento proporciona a utilização de um composto consistindo em:

- um péptido de 5 a 15 aminoácidos compreendendo uma sequência de aminoácidos seleccionada de entre o grupo que consiste em DKELRI, DWELRI, YAEFRG, EAEFRG, DYEFRG, DRELRI, GREFRN, EYEFRG, DWEFRDA, SWEFRT e DKELR, contendo o referido péptido um resíduo de cisteína adicional no terminal C e
- um transportador proteico ligado através do referido resíduo de cisteína ao referido péptido para a preparação de uma vacina para a doença de Alzheimer (DA).

De acordo com o presente invento é utilizado um mimotopo de Aβ42 para vacinação contra DA. O mimotopo induz a produção de anticorpos contra Aβ42 mas não contra o APP nativo. O mimotopo pode ser identificado com um anticorpo (monoclonal) e bibliotecas peptídicas (comercialmente disponível) (*e.g.*, de acordo com Reineke *et al.*,

"Identification of distinct antibody epitopes and mimotopes from a peptide array of 5520 randomly generated sequences" *J. Immunol. Methods* 267: 37, 2002). É utilizado um anticorpo (monoclonal) que não reconhece APP mas detecta apenas diferentes espécies Aβ com ácido aspártico amino-terminal (um exemplo para um tal anticorpo é descrito em Johnson-Wood *et al.*, "Amyloid precursor protein processing and Aβ42 deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease" *PNAS* 94: 1550, 1997). Provou-se que um tal anticorpo é uma ferramenta ideal para identificar mimotopos adequados para vacinas no curso do presente invento. Embora se tenha mostrado que tais anticorpos monoclonais têm efeitos benéficos num modelo de ratinho de DA quando directamente administrados a ratinhos (Bard *et al.*, "Peripherally administered antibodies against amyloid β-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease" *Nature Med* 6: 916, 2000), estes anticorpos nunca foram propostos para serem utilizados como ferramentas de pesquisa de mimotopos para isolamento de compostos de vacina de DA.

Na arte anterior, todos os esforços foram concentrados no péptido Aβ de ocorrência natural. Tal como mencionado acima, os ensaios clínicos da vacina de péptido Aβ foram parados devido a acontecimentos de neuro-inflamação. De facto, programas de predição de epitopos de células T (BIMAS para epitopos restritos à classe I e TEPITOPE para epitopos restritos à classe II) propõem epitopos de elevado registo (próprios) dentro da sequência.

Isto pode implicar que os acontecimentos neuroinflamatórios são devidos a reacções auto-imunes que tornariam uma tal vacina inadequada para uma aplicação geral.

Em contraste com tais vacinas de Aβ propostas pela arte anterior, não se espera que ocorram reacções auto-imunes durante o tratamento com uma vacina contendo um mimotopo de acordo com o presente invento, porque o anticorpo (monoclonal) utilizado para identificação do mimotopo de acordo com o presente invento não reconhece APP e a sequência do mimotopo é diferente das sequências próprias derivadas de Aβ42 que foram utilizadas em ensaios realizados até agora ou que deverão ser utilizadas em ensaios futuros.

O anticorpo utilizado para a identificação do mimotopo de acordo com o presente invento detecta a sequência de aminoácidos derivada de Aβ DAEFRH (= epitopo original) com um ácido aspártico amino-terminal livre, assim não reconhece a APP nativa. O anticorpo pode ser uma preparação de anticorpo monoclonal ou policlonal ou qualquer parte de anticorpo ou derivado deste, sendo o único pré-requisito que a molécula de anticorpo reconheça especificamente o epitopo DAEFRH, i.e. que não se ligue às formas prolongadas N-terminalmente naturais da proteína precursora amilóide, o que significa que a capacidade de ligação ao epitopo DAEFRH é pelo menos 100 vezes, de preferência pelo menos 1000 vezes, de maior preferência pelo menos 10^5 vezes, superior à da molécula APP. O

anticorpo pode ser um anticorpo mostrando a mesma capacidade de ligação à sequência DAEFRH ou superior que o anticorpo descrito por Johnson-Wood *et al.*, 1997. Claro que, também podem ser utilizados anticorpos com uma capacidade de ligação inferior (>10%, >50% ou >80% da capacidade de ligação do anticorpo de Johnson-Wood *et al.*), embora a capacidade de ligação superior seja mais preferida.

Os compostos de acordo com o presente invento ligam-se aos anticorpos com especificidade comparável à da sequência DAEFRH.

De preferência, os mimotopos de acordo com o presente invento têm um comprimento de entre 5 e 15, 6 e 12 resíduos de aminoácidos, especificamente entre 9 e 11. Os mimotopos de acordo com o presente invento são ligados a transportadores proteicos através de uma cisteína adicional no terminal C. Para além disso, os transportadores proteicos podem consistir ou conter epitopos de células T ajudantes.

De preferência, o transportador farmaceuticamente aceitável é KLH, toxóide do tétano, proteína de ligação à albumina, albumina de soro bovino, um dendrímero (MAP; *Biol. Chem.* 358: 581) bem como as substâncias adjuvantes descritas em Singh *et al.*, *Nat. Biotech.* 17: 1075-1081, 1999 (especificamente as na tabela 1 deste documento) e O'Hagan *et al.*, *Nature Reviews, Drug Discovery* 2(9): 727-

735, 2003 (especificamente os compostos potenciadores imunitários inatos e os sistemas de distribuição aqui descritos) ou misturas destes. Adicionalmente, a composição de vacina pode conter hidróxido de alumínio.

Uma vacina compreendendo o presente composto (mimotopo) e um transportador farmaceuticamente aceitável podem ser administrados através de qualquer modo de aplicação adequado, *e.g.* i.v., i.p., i.m., intranasal, oral, subcutâneo, etc. e em qualquer dispositivo de distribuição adequado (O'Hagan *et al.*, *Nature Reviews, Drug Discovery* 2(9): 727-735, 2003). Tipicamente, a vacina contém o composto de acordo com o presente invento numa quantidade de 0,1 ng a 10 mg, de preferência 10 ng a 1 mg, especialmente 100 ng a 100 µg ou, alternativamente *e.g.* 100 fmole a 10 µmole, de preferência 10 pmole a 1 µmole, especificamente 100 pmole a 100 nmole. A vacina pode também compreender substâncias auxiliares típicas, *e.g.*, tampões, estabilizadores, etc.

Um método para isolamento de um composto que se ligue a um anticorpo que seja específico para a sequência N-terminal de Aβ42 DAEFRH compreende os passos de:

- proporcionar um composto peptídico compreendendo péptidos contendo a seguinte sequência de aminoácidos $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$, em que X_1 é um aminoácido, excepto C, X_2 é um aminoácido, excepto C, X_3 é um aminoácido, excepto C, X_4 é um aminoácido, excepto C, X_5 é um aminoácido, excepto C, X_6 é um aminoácido, excepto C, e em que $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ não é DAEFRH,

- contacto da referida biblioteca peptídica com o referido anticorpo e
- isolamento dos membros da biblioteca peptídica que se ligam ao referido anticorpo.

Um método específico para isolamento de um composto que se ligue a um anticorpo que seja específico para a sequência N-terminal natural de Aβ42 DAEFRH compreende os passos de:

- proporcionar uma biblioteca de compostos peptídicos contendo a seguinte sequência de aminoácidos $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$, em que X_1 é um aminoácido natural, excepto K e C, X_2 é um aminoácido natural, excepto C, X_3 é um aminoácido natural, excepto K e C, X_4 é um aminoácido natural, excepto K e C, X_5 é um aminoácido natural, excepto C, X_6 é um aminoácido natural, excepto P e C, e em que $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ não é DAEFRH,
- contacto da referida biblioteca peptídica com o referido anticorpo e
- isolamento dos membros da biblioteca peptídica que se ligam ao referido anticorpo.

O isolamento de 5-meros adequados de acordo com o presente invento pode ser alcançado através do modo descrito acima, adaptado a bibliotecas com 5 variáveis de aminoácidos e pode ser de preferência efectuado através da pesquisa de uma biblioteca possuindo as variáveis de aminoácidos X_1 a X_5 tal como aqui descrito ou através da identificação de 5-meros adequados num membro positivo

pesquisado numa biblioteca de 6-meros (ver acima). Do mesmo modo, podem também ser concordantemente aplicadas bibliotecas de 7-meros, 8-meros, 9-meros, 10-meros, etc. para pesquisar sequências adequadas que se liguem ao presente tipo de anticorpo. Fragmentos de ligação ao anticorpo adequados de tais sequências mais longas podem ser verificados, *e.g.*, através de testes destes fragmentos com um comprimento de 5, 6, 7, 8, 9, etc. resíduos de aminoácidos para ligação ao presente invento anticorpo.

Um tal método provou ter sucesso para proporcionar mimotopos Aβ de acordo com o presente invento.

De preferência, os referidos péptidos são proporcionados de forma individualizada na referida biblioteca, especialmente imobilizados numa superfície sólida, tal como possível *e.g.* com a tecnologia de péptidos MULTIPIN™. A biblioteca pode também ser proporcionada como uma mistura peptídica e os complexos anticorpo:péptido podem ser isolados após ligação do anticorpo. Alternativamente, o anticorpo pode ser imobilizado e a biblioteca peptídica (em suspensão ou solução) é então posta em contacto com os anticorpos imobilizados.

De preferência, a pesquisa de anticorpos (ou dos membros da biblioteca peptídica) compreende um marcador adequado que permite a detecção ou o isolamento do anticorpo ou do complexo anticorpo:péptido quando ligado a um péptido da biblioteca. Sistemas marcadores adequados

(i.e., biotinilação, fluorescência, radioactividade, marcadores magnéticos, marcadores de revelação de cor, anticorpos secundários) estão facilmente disponíveis aos peritos na arte.

A biblioteca tem de ser construída para excluir a sequência de Aβ de ocorrência natural (*e.g.*, DAEFRH), uma vez que a vacinação com esta sequência está claramente excluída deste invento.

Uma outra técnica adequada para isolamento dos epitopos de acordo com o presente invento é a pesquisa em bibliotecas peptídicas em fagos tal como descrito *e.g.* em WO 03/020750.

O presente invento refere-se também a uma vacina contra a doença de Alzheimer compreendendo um composto consistindo em:

- um péptido de 5 a 15 aminoácidos compreendendo uma sequência de aminoácidos seleccionada de entre o grupo que consiste em DKELRI, DWELRI, YAEFRG, EAEFRG, DYEFRG, DRELRI, GREFRN, EYEFRG, DWEFRDA, SWEFRT e DKELR, contendo o referido péptido um resíduo de cisteína adicional no terminal C e
- um transportador proteico ligado através do referido resíduo de cisteína ao referido péptido. Estas sequências são puramente mimitopos de Aβ artificiais. Os péptidos são - para fins de vacinação - ligados a transportadores proteicos adequados através de uma cisteína

adicional no terminal C e administrados de um modo adequado (tal como descrito *e.g.* em O'Hagan *et al.*, *Nature Reviews, Drug Discovery* 2(9): 727-735, 2003).

O invento é ainda descrito nos seguintes exemplos e figuras dos desenhos, claro que sem estar restrito a estes.

A Fig. 1 mostra os membros peptídicos individualizados da biblioteca 4 utilizados para os presentes processos de pesquisa.

A Fig. 2 mostra um ensaio de inibição com mimotopos para DAEFRH.

A Fig. 3 mostra outro ensaio de inibição com outros mimotopos para DAEFRH.

As Figuras 4 e 5 descrevem os resultados de ensaios de inibição efectuados com péptidos mimotopo de acordo com o presente invento.

EXEMPLOS:

1: Criação de anticorpos monoclonais (mAb) para detectar espécies peptídicas derivadas de Aβ42 com o terminal N livre (ácido aspártico livre no terminal N)

Foram vacinados ratinhos com o péptido 6-mero DAEFRH (sequência N-terminal natural de Aβ42) ligado à

proteína albumina de soro bovino BSA (para utilizar o efeito transportador do hapteno), emulsionado em CFA (primeira injecção) e IFA (injecções de reforço). Hibridomas produtores de anticorpos específicos do péptido DAEFRH são detectados através de ELISA (placas de ELISA revestidas com péptido DAEFRH). O péptido SEVKMDAEFRH (sequência natural prolongada N-terminalmente, derivada de APP, contendo a sequência derivada de Aβ42 DAEFRH) é utilizado como péptido de controlo negativo: os hibridomas que reconhecem o péptido prolongado são excluídos porque não distinguem entre péptidos derivados de Aβ42 com ácido aspártico livre no terminal N e o péptido DAEFRH derivado de APP sem ácido aspártico livre.

2: Construção de bibliotecas peptídicas

Os mimotopos do presente invento foram verificados através de adaptação do método de Reinke *et al.*, 2000, através de pesquisa de bibliotecas peptídicas de ligação a um anticorpo (de preferência um anticorpo monoclonal) que seja específico para a espécie Aβ com ácido aspártico amino-terminal. Outro método está comercialmente disponível como tecnologia de péptidos MULTIPIN™.

A tecnologia de péptidos MULTIPIN™ envolve a síntese de péptidos em alfinetes de polietileno especialmente preparados montados em blocos num formato que é compatível com a placa de microtitulação padrão de 8×12 utilizada para muitos ensaios biológicos. Tanto os péptidos

ligados aos alfinetes (péptidos não cliváveis que permanecem ligados covalentemente ao alfinete) como os da fase de solução (os que foram clivados da superfície do alfinete) podem ser produzidos através deste método. Os PepSets, com base no sistema de síntese Multipin, permitem a síntese e pesquisa simultâneas de grandes números de péptidos.

Os PepSets consistem em blocos de 96 péptidos sintetizados individualmente, dois dos quais são sequências de controlo cuidadosamente seleccionadas. Os controlos clivados são avaliados quanto à pureza através de HPLC de fase reversa e o teor peptídico é quantificado através de análise dos aminoácidos. Os controlos não cliváveis positivos e negativos são avaliados através de técnicas de ELISA padrão.

Os péptidos PepSet estão disponíveis com uma variedade de modificações químicas incluindo acetilação, biotinilação, fosforilação e ciclização. Os péptidos da fase de solução (clivados) são enviados como pós liofilizados.

Para a produção de péptidos em fase de solução há uma escolha de terminações C-terminais, incluindo ácido e amida, dependendo da aplicação pretendida do péptido. A ligação clivável é incorporada à superfície do alfinete, como um derivado éster pré-formado do aminoácido C-terminal ou no ligador amida "Rink". Os péptidos com grupos

terminais ácido ou amida são então libertados através de tratamento do péptido ligado ao alfinete com ácido forte. As opções para a escala de síntese são uma escala nominal de 1 micromole ou 5 micromoles. Factores tais como hidrofobicidade e eficiência de clivagem afectarão a recuperação dos péptidos, de modo a que o rendimento esperado seja de 0,5 a 1 micromole (em torno de 1 mg de um péptido 15-mero) quando os péptidos são sintetizados na escala nominal de 1 micromole, ou um rendimento de 2,5 a 5 micromoles para péptidos sintetizados na escala nominal de 5 micromoles.

Os péptidos não cliváveis permanecem covalentemente ligados aos alfinetes e podem ser utilizados para pesquisar rapidamente péptidos de interesse utilizando técnicas ELISA. Tais péptidos são úteis para os fins de varrimento de epitopos de anticorpos e estudos da relação estrutura-actividade (SAR). A remoção de anticorpos ou outras proteínas ligados regenera os péptidos e permite a sua reutilização noutros ensaios. Os PepSets são utilizados para uma variedade de aplicações incluindo a identificação de péptidos guia de interesse biológico a partir do varrimento de sequências proteicas, optimização dos péptidos guia, e desenvolvimento de novas gerações de análogos. A flexibilidade em termos de estratégia global utilizada em procedimentos de pesquisa é grandemente aumentada através da utilização de uma variedade de desenhos de síntese que em conjunto proporcionam um método sistemático para caracterizar completamente os candidatos guia.

Os resultados compreensivos obtidos a partir de conjuntos sistemáticos de péptidos não só identificam péptidos de interesse, mas também indicam resíduos críticos, a sua capacidade de substituição e o comprimento óptimo do péptido. Consequentemente, uma variedade de péptidos aparentados pode ser ordenada como resultado de tais descobertas. A substituição de L-aminoácidos com D-aminoácidos e outros resíduos invulgares é uma poderosa abordagem para manipular a estrutura e conformação de um péptido. Este método é também um modo rápido para descobrir novos análogos com diferentes propriedades farmacológicas, tais como antagonistas e péptidos com maior estabilidade.

Começando com uma sequência proteica conhecida, todos os epitopos sequenciais do anticorpo podem ser mapeados utilizando a abordagem Multipin. Vários procedimentos alternativos para mapeamento de epitopos sequenciais de células B são agora possíveis. Estes incluem péptidos ligados a alfinetes, péptidos em fase de solução revestidos directamente em placas de microtitulação, e péptidos biotinilados capturados em placas de microtitulação previamente revestidas com avidina ou estreptavidina.

Para os presentes exemplos, o anticorpo descrito no exemplo 1 é utilizado para pesquisa de bibliotecas de péptidos, no entanto, qualquer preparação de anticorpo que reconheça especificamente a sequência DAEFRH, mas não a sequência naturalmente prolongada N-terminalmente da

molécula Aβ (*e.g.*, MDAEFRH, KMDAEFRH, SEVKMDAEFRH ou a proteína (precursora) amilóide, APP, completa), tal como *e.g.* descrito por Johnson-Wood *et al.*, 1997.

Foram construídas quatro bibliotecas para este fim:

2.1: Biblioteca 1

Esta biblioteca de 6-meros contém péptidos com as seguintes sequências (posições de aminoácidos 1 a 6):

Posição 1: todos os aa naturais excepto D, K e C (17 possibilidades)

Posição 2: todos os aa naturais excepto A, K e C (17 possibilidades)

Posição 3: todos os aa naturais excepto E, K e C (17 possibilidades)

Posição 4: todos os aa naturais excepto F, K e C (17 possibilidades)

Posição 5: todos os aa naturais excepto R, K e C (17 possibilidades)

Posição 6: todos os aa naturais excepto H, K, C e P (16 possibilidades)

A biblioteca 1 é uma mistura de hexapéptidos. Teoricamente estão incluídos todos os péptidos possíveis contendo 17 aminoácidos diferentes (ver abaixo). A mistura não contém qualquer resíduo de lisina ou cisteína. Para além disso, a mistura não contém:

ácido aspártico na posição específica 1,
alanina na posição específica 2,
ácido glutâmico na posição específica 3,
fenilalanina na posição específica 4,
arginina na posição específica 5, e
histidina na posição específica 6.

A síntese é efectuada num Sintetizador Applied Biosystems 431A seguindo o protocolo de FastMoc, com uma escala de síntese de 0,25 mmol.

A síntese começa com o peso de 1 mmol de todos os aminoácidos desejados (grupos amino e cadeias laterais protegidas). Depois, foi produzida uma mistura de Asn, Gln, Gly, Ile, Leu, Met, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val. Específicos da posição, são adicionados os seguintes aminoácidos:

Ala, Glu, Phe, Arg, His (posição/mistura 1),
Asp, Glu, Phe, Arg, His (posição/mistura 2),
Asp, Ala, Phe, Arg, His (posição/mistura 3),
Asp, Ala, Glu, Arg, His (posição/mistura 4),
Asp, Ala, Glu, Phe, His (posição/mistura 5), e
Asp, Ala, Glu, Phe, Arg (posição/mistura 6 sem Pro).

A Mistura 6 foi utilizada para carregar a resina (resina de 2-cloro-tritilcloreto, 1,49 mmol/g, Alexis Germany):

1 mmol de mistura 6 de resíduos de aminoácidos

611 mg de resina (= 0,91 mmol de grupos reactivos)

15 ml de diclorometano

5,5 equivalentes = 5 mmol de diisopropiletilamina (871 µl).

A mistura é agitada num balão durante 1 h. Depois, é adicionado 1 ml de metanol e a mistura é agitada durante mais 10 min. A resina carregada é extraída através de uma frita e lavada duas vezes com dimetilformamida, diclorometano, isopropanol, metanol e éter (30 ml de cada). A secagem é efectuada de um dia para o outro num vácuo elevado. A quantidade pesada é de 737 mg.

Uma alíquota de 5,66 mg é tratada durante 30 min com 1 ml de piperidina a 20% em DMF para definir a densidade da resina. Depois, a mistura é centrifugada. O grupo protector Fmoc livre é medido fotometricamente no sobrenadante (301 nm, coeficiente de extinção = 7800 M (e-1)). Concordantemente, a densidade da resina é de 0,49 mmol/g.

Todos os passos seguintes são efectuados no sintetizador, utilizando as outras misturas (colocadas em 5 cartuchos diferentes). São utilizados 515 mg de resina carregada (correspondendo a 0,25 mmol: as misturas de aminoácidos são utilizadas num excesso de 4 vezes). O grupo

protector Fmoc N-terminal é clivado no final da síntese. Após lavagem com etanol e secagem de um dia para o outro, a clivagem dos péptidos da resina é alcançada através de TFA/H_2O (95:5, v:v). A solução de TFA é concentrada num Speed Vac até 1/5 do volume e precipitada e lavada em éter dietílico e liofilizada.

Os péptidos 6-mero EIDYHR, ELDYHR e EVDYHR são exemplos de mimotopos que podem ser detectados através do anticorpo monoclonal produzido de acordo com o exemplo 1 acima.

2.2: Biblioteca 2

Esta biblioteca de 6-meros contém péptidos com as seguintes sequências (posições de aminoácidos 1 a 6):

Posição 1: D (fixada)

Posição 2: todos os aa naturais excepto A, K e C (17 possibilidades)

Posição 3: todos os aa naturais excepto E, K e C (17 possibilidades)

Posição 4: todos os aa naturais excepto F, K e C (17 possibilidades)

Posição 5: todos os aa naturais excepto R, K e C (17 possibilidades)

Posição 6: todos os aa naturais excepto H, K, C, e P (16 possibilidades).

A biblioteca de péptidos 2 foi construída de acordo com o método descrito acima (em 2.1) para a biblioteca 1.

Os péptidos 6-mero DIDYHR, DLDYHR e DVDYHR são exemplos de mimotopos que podem ser detectados através do anticorpo monoclonal produzido de acordo com 1. acima.

2.3: Biblioteca 3

Uma terceira biblioteca peptídica é utilizada numa abordagem adicional para definir sequências de mimotopos. Esta biblioteca contém a sequência original e permite a detecção de mimotopos mais intimamente aparentados com o epitopo original.

Esta biblioteca de 6-meros contém péptidos com as seguintes sequências (posições de aminoácidos 1 a 6):

Posição 1: todos os aa naturais excepto K e C (18 possibilidades)

Posição 2: todos os aa naturais excepto K e C (18 possibilidades)

Posição 3: todos os aa naturais excepto K e C (18 possibilidades)

Posição 4: todos os aa naturais excepto K e C (18 possibilidades)

Posição 5: todos os aa naturais excepto K e C (18 possibilidades)

Posição 6: todos os aa naturais excepto K, C e P (17 possibilidades).

A biblioteca peptídica 3 foi construída de acordo com o método descrito acima (em 2.1.) para a biblioteca 1.

Os péptidos 6-mero DIDYRR, DLDYRR e DVDYRR são exemplos de mimotopos que podem ser detectados através do anticorpo monoclonal produzido de acordo com 1. acima (D na posição 1 e R na posição 5 são idênticos ao epitopo original).

2.4: Biblioteca 4

Esta biblioteca peptídica 4 consiste em 5×18=90 péptidos, está comercialmente disponível em Mimotopes Ltd. (Paris, França; ver linhas directrizes do fabricante) e é desenhada de acordo com a sequência natural N-terminal de Aβ42 DAEFRH.

Posição 1: D (fixada)

Posição 2: todos os aminoácidos naturais excepto K e C (18 péptidos diferentes)

Posição 3: todos os aminoácidos naturais excepto K e C (18 péptidos diferentes)

Posição 4: all natural amino acids-except of K e C (18 péptidos diferentes)

Posição 5: todos os aminoácidos naturais excepto K e C (18 péptidos diferentes)

Posição 6: todos os aminoácidos naturais excepto K e C (18 péptidos diferentes).

Os membros peptídicos individualizados da biblioteca 4 estão representados na Fig. 1. Os péptidos nº. 1, 24, 48, 56 e 80 têm a sequência original da sequência N-terminal de Aβ42. Todos os outros péptidos são péptidos candidatos que são testados em relação à sua capacidade de ligação a um anticorpo que se ligue a DAEFRH.

2.5: ELISA com bibliotecas peptídicas

Tal como mencionado acima, as bibliotecas peptídicas 1, 2 e 3 são geradas com um sintetizador de péptidos Applied Biosystems 431A seguindo química Fmoc clássica. A biblioteca peptídica 4 comercialmente disponível é gerada de acordo com a descrição do fabricante (ver acima e em www.mimotopes.com). Os 90 péptidos estão ligados C-terminalmente a um alfinete.

O ELISA com cada uma das bibliotecas peptídicas foi realizado seguindo protocolos padrão:

A biblioteca peptídica é dissolvida em DMSO a 100% (concentração final de 10 mg/ml).

A solução peptídica é ainda diluída em PBS.

A mistura peptídica é revestida de um dia para o outro (4°C) em placas de ELISA (Nunc Maxisorp, Alemanha), a começar com 500 µg/poço e titulada a 100 ng/poço.

As placas são lavadas 3× vezes com PBS/Tween 20 (0,1% v/v).

As placas são bloqueadas com PBS/BSA (2 h à temperatura ambiente).

As placas são lavadas 3× vezes com PBS/Tween.

As placas são incubadas com mAb específico de DAEFRH biotinilado (10 µg/ml em PBS) durante 4 h à temperatura ambiente.

As placas são lavadas 3× vezes com PBS/Tween.

As placas são incubadas com estreptavidina-peroxidase de rábano (30 min à temperatura ambiente).

As placas são lavadas 5× vezes com PBS/Tween.

As placas são incubadas com ABTS+H_2O_2 (0,1% p/v; 10 a 45 min) e a reacção é parada com ácido cítrico seguido de avaliação fotométrica (comprimento de onda 405 nm).

3: Verificação de mimotopos através de ensaio de inibição

3.1. Biblioteca adicional

Para além das 4 bibliotecas descritas acima (ver 2.1., 2.2., 2.3. e 2.4.) uma quinta biblioteca é utilizada para definir sequências de mimotopos. Esta biblioteca de 6-meros está comercialmente disponível em microcolecções EMC (Tübingen, Alemanha) e contém 114 misturas diferentes de hexapéptidos, uma posição por mistura é definida por um de todos os aa naturais excepto C (19 possibilidades), as restantes 5 posições são variáveis:

Misturas 01 a 06 (uma posição fixada, alanina A, restantes 5 variáveis, X):

Mistura 01: AXXXXX

Mistura 02: XAXXXX

Mistura 03: XXAXXX

Mistura 04: XXXAXX

Mistura 05: XXXXAX

Mistura 06: XXXXXA

Misturas 07 a 12 (uma posição fixada, arginina R, restando 5 variáveis, X):

Mistura 07: RXXXXX

Mistura 08: XRXXXX

Mistura 09: XXRXXX

Mistura 10: XXXRXX

Mistura 11: XXXXRX

Mistura 12: XXXXXR

Concordantemente, as mistura 13 a 114 são desenhadas utilizando todos os aa naturais excepto C.

3.2. Ensaio de inibição

As Figuras 2 e 3 descrevem os resultados de ensaios de inibição realizados com péptidos mimotopo incluídos e obtidos a partir das 5 bibliotecas (tal como descrito). Os péptidos mimotopo competem com o epitopo original pelo reconhecimento pelo anticorpo monoclonal. O epitopo original e os péptidos mimotopo contêm um C adicional no terminal C para ligação a um transportador proteico (se desejado).

São utilizados os seguintes péptidos:

Péptido 1737 DAEFRH

Péptido 3001 DKELRI

Péptido 3002 DWELRI

Péptido 3003 YREFFI

Péptido 3004 YREFRI

Péptido 3005 YAEFRG

Péptido 3006 EAEFRG

Péptido 3007 DYEFRG

Péptido 3008 ELEFRG

Péptido 3009 SFEFRG

Péptido 3010 DISFRG

Péptido 3011 DIGWRG

Procedimento:

Placas de ELISA (Nunc Maxisorp) são revestidas com o epitopo peptídico original DAEFRH (prolongado C-terminalmente com C e ligado a albumina de soro bovino BSA) a uma concentração de péptido-BSA de 0,1 µg/ml (100 µl/poço, 12h, 4°C). Após bloqueio com PBS/BSA a 1% (200 µl/poço, 12h, 4°C), as placas são lavadas 3× vezes com PBS/Tween. Depois, o anticorpo monoclonal biotinilado (1:2000, 50 µl/poço) e os péptidos (50 µl/poço) a 50, 5, 05, 0,05, 0,005 e 0,0005 µg/ml são adicionados durante 20 min a 37°C. As placas são lavadas 3× vezes com PBS/Tween e são incubadas com estreptavidina marcada com peroxidase de rábano (HRP) (100 µl/poço, 30 min, TA). As placas são lavadas 5× vezes com PBS/Tween e são incubadas com ABTS+H_2O_2 (0,1% p/v, 10 a 45 min) e a reacção é parada com ácido cítrico seguido de avaliação fotométrica (comprimento de onda 405 nm).

Tal como esperado e observado na Fig. 2, o péptido 1737 DAEFRH pode competir com péptido DAEFRH ligado a BSA e ligado à placa e inibe assim o reconhecimento pelo anticorpo monoclonal. Para além disso, mostra-se que o péptido 3003 não é capaz de inibir a ligação do anticorpo monoclonal ao epitopo original. Em contraste, os péptidos 3001, 3002, 3004, 3005, 3006 e 3007 (numa extensão diferente) bloqueiam o reconhecimento do epitopo. Enquanto o péptido 3004 é apenas inibidor a uma elevada concentração (50 µg/ml), os péptidos 3001, 3006 e 3007 são fortemente inibidores com uma CI_{50} de menos de 0,5 µg/ml. Os péptidos 3002 e 3005 são inibidores "intermédios" com uma CI_{50} de mais de 0,5 µg/ml.

Tal como esperado e observado na Fig. 3, o péptido 1737 DAEFRH pode competir com sucesso com o péptido DAEFRH ligado a BSA e ligado à placa pelo reconhecimento pelo anticorpo monoclonal numa experiência independente efectuada adicionalmente. Para além disso, mostra-se que os péptidos 3010 e 3011 não são inibidores nas concentrações testadas, enquanto os péptidos 3008 e 3009 são inibidores (relativamente) fracos com uma CI_{50} de menos de 5 µg/ml.

A Tabela 1 resume brevemente a capacidade inibidora dos mimotopos incluídos e obtidos a partir das bibliotecas (tal como descrito):

Tabela 1: Capacidade inibidora dos mimotopos:

Péptido	3001	DKELRI Forte
Péptido	3002	DWELRI intermédia
Péptido	3003	YREFFI nenhuma
Péptido	3004	YREFRI fraca
Péptido	3005	YAEFRG intermédia
Péptido	3006	EAEFRG forte
Péptido	3007	DYEFRG forte
Péptido	3008	ELEFRG fraca
Péptido	3009	SFEFRG fraca
Péptido	3010	DISFRG nenhuma
Péptido	3011	DIGWRG nenhuma

4. Ensaio de inibição para mimotopos adicionais pesquisados de acordo com o presente invento

Ensaio de inibição

As Figuras 4 e 5 descrevem os resultados dos ensaios de inibição realizados com péptidos mimotopo incluídos e obtidos a partir das 5 bibliotecas (tal como descrito). Os péptidos mimotopo competem com o epitopo original pelo reconhecimento pelo anticorpo monoclonal. O epitopo original e os péptidos mimotopo contêm um C adicional no terminal C (posição 7) para ligação a um transportador proteico (se desejado).

São utilizados os seguintes péptidos:

Péptido 1737 DAEFRH (epitopo original + C)

Péptido 1234 KKELRI

Péptido 1235 DRELRI

Péptido 1236 DKELKI

Péptido 1237 DRELKI

Péptido 1238 DKELR

Péptido 1239 EYEFRG

Péptido 1241 DWEFRDA

Péptido 4D02 SWEFRT

Péptido 4003 GREFRN

Péptido 4004 WHWSWR

Procedimento:

Placas de ELISA (Nunc Maxisorp) são revestidas com o epitopo peptídico original DAEFRH (prolongado C-terminalmente com C e ligado a albumina de soro bovino BSA) a uma concentração de péptido-BSA de 0,1 µg/ml (100 µl/poço, 12h, 4°C). Após bloqueio com PBS/BSA a 1% (200 µl/poço, 12h, 4°C), as placas são lavadas 3× vezes com PBS/Tween. Depois, o anticorpo monoclonal biotinilado (1:2000, 50 µl/poço) e os péptidos (50 µl/poço) a diferentes concentrações são adicionados durante 20 min a 37°C. As placas são lavadas 3× vezes com PBS/Tween e são incubadas com estreptavidina marcada com peroxidase de rábano (HRP) (100 µl/poço, 30 min, TA). As placas são lavadas 5× vezes com PBS/Tween e são incubadas com ABTS+H_2O_2 (0,1% p/v, 10 a 45 min) e a reacção é parada com

ácido cítrico seguido de avaliação fotométrica (comprimento de onda 405 nm).

Tal como esperado e observado na Fig. 4, o péptido 1737 DAEFRH pode competir com o péptido DAEFRH ligado a BSA e ligado à placa e inibe assim o reconhecimento pelo anticorpo monoclonal. Para além disso, mostra-se que o péptido 4004 não é capaz de inibir a ligação do anticorpo monoclonal ao epitopo original. Em contraste, os péptidos 4002 e 4003 (numa extensão diferente) bloqueiam o reconhecimento do epitopo. Enquanto o péptido 4003 é apenas inibidor a uma concentração relativamente elevada (10 µg/ml), o péptido 4002 é fortemente inibidor com uma CI_{50} de menos de 0,4 µg/ml.

Tal como esperado e observado na Fig. 5, o péptido 1737 DAEFRH pode competir com sucesso com o péptido DAEFRH ligado a BSA e ligado à placa pelo reconhecimento pelo anticorpo monoclonal numa experiência independente efectuada adicionalmente. Para além disso, mostra-se que o péptido 1234 é dificilmente inibidor nas concentrações testadas, enquanto os péptidos 1235, 1236, 1237, 1238, 1239 e 1241 (numa extensão diferente) bloqueiam o reconhecimento do epitopo. Os péptidos 1235, 1238 e 1241 são fortes inibidores com uma CI_{50} de menos de 0,5 µg/ml, enquanto os péptidos 1236 e 1237 são inibidores (relativamente) fracos com uma CI_{50} de mais de 5 µg/ml. O péptido 1239 é um inibidor intermédio com uma CI_{50} de mais de 0,5 µg/ml.

A Tabela 2 resume brevemente a capacidade inibidora dos mimotopos incluídos e obtidos a partir das bibliotecas (tal como descrito):

Tabela 2: Capacidade inibidora dos mimotopos

Péptido	1234	KKELRI	nenhuma
Péptido	1235	DRELRI	forte
Péptido	1236	DKELKI	fraca
Péptido	1237	DRELKI	fraca
Péptido	1238	DKELR	forte
Péptido	1239	EYEFRG	intermédia
Péptido	1241	DWEFRDA	forte
Péptido	4002	SWEFRT	forte
Péptido	4003	GREFRN	fraca
Péptido	4004	WHWSWR	nenhuma

Os resultados apresentados nas Figuras 4 e 5 mostram que para além de vários péptidos 6-mero (tal como mostrado aqui e antes), péptidos 5-mero (nomeadamente o péptido 1238 DKELR) e péptidos 7-mero (nomeadamente o péptido 1241 DWEFRDA) podem ser utilizados como epitopos numa vacina de Alzheimer baseada em mimotopos.

Lisboa, 30 de Março de 2010

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de um composto consistindo em:

- um péptido de 5 a 15 aminoácidos compreendendo uma sequência de aminoácidos, seleccionada de entre o grupo que consiste em DKELRI, DWELRI, YAEFRG, EAEFRG, DYEFRG, DRELRI, GREFRN, EYEFRG, DWEFRDA, SWEFRT e DKELR, contendo o referido péptido um resíduo de cisteína adicional no terminal C e

- um transportador proteico ligado através do referido resíduo de cisteína ao referido péptido

para a preparação de uma vacina para a doença de Alzheimer (DA).

2. Utilização de acordo com a reivindicação 1 **caracterizada por** o referido péptido ter um comprimento de 6 a 12 aminoácidos.

3. Utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2 **caracterizada por** o transportador proteico ser KLH.

4. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores **caracterizada por** a vacina compreender ainda hidróxido de alumínio.

5. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores **caracterizada por** a vacina conter o composto numa quantidade de 0,1 ng a 10 mg.

6. Vacina contra a doença de Alzheimer compreendendo um composto consistindo em:

- um péptido de 5 a 15 aminoácidos compreendendo uma sequência de aminoácidos seleccionada de entre o grupo que consiste em DKELRI, DWELRI, YAEFRG, EAEFRG, DYEFRG, DRELRI, GREFRN, EYEFRG, DWEFRDA, SWEFRT e DKELR, contendo o referido péptido um resíduo de cisteína adicional no terminal C e
- um transportador proteico ligado através do referido resíduo de cisteína ao referido péptido.

7. Vacina de acordo com a reivindicação 6 **caracterizada por** o transportador proteico ser KLH.

8. Vacina de acordo com a reivindicação 6 ou 7 **caracterizada por** compreender ainda hidróxido de alumínio.

9. Vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 8 **caracterizada por** conter o composto numa quantidade de 0,1 ng a 10 mg.

Lisboa, 30 de Março de 2010

Fig. 1A

1	alanina	ala	A
2	arginina	arg	R
3	asparagina	asn	N
4	ácido aspártico	asp	D
5	cisteína	cys	C
6	glutamina	gln	Q
7	ácido glutâmico	glu	E
8	glicina	gly	G
9	histidina	his	H
10	isoleucina	ile	I
11	leucina	leu	L
12	lisina	lys	K
13	metionina	met	M
14	fenilalanina	phe	F
15	prolina	pro	P
16	serina	ser	S
17	treonina	thr	T
18	triptofano	trp	W
19	tirosina	tyr	Y
20	valina	val	V

Fig.1B

No.	D	A	E	F	R	H	
1	D	A	E	F	R	H	controlo positivo
2	D	R	E	F	R	H	
3	D	N	E	F	R	H	
4	D	D	E	F	R	H	
5	D	Q	E	F	R	H	
6	D	E	E	F	R	H	
7	D	G	E	F	R	H	
8	D	H	E	F	R	H	
9	D	I	E	F	R	H	
10	D	L	E	F	R	H	
11	D	M	E	F	R	H	
12	D	F	E	F	R	H	
13	D	P	E	F	R	H	
14	D	S	E	F	R	H	
15	D	T	E	F	R	H	
16	D	W	E	F	R	H	
17	D	Y	E	F	R	H	
18	D	V	E	F	R	H	
19	D	A	A	F	R	H	
20	D	A	R	F	R	H	
21	D	A	N	F	R	H	
22	D	A	D	F	R	H	
23	D	A	Q	F	R	H	
24	D	A	E	F	R	H	controlo positivo
25	D	A	G	F	R	H	
26	D	A	H	F	R	H	
27	D	A	I	F	R	H	
28	D	A	L	F	R	H	
29	D	A	M	F	R	H	
30	D	A	F	F	R	H	
31	D	A	P	F	R	H	
32	D	A	S	F	R	H	
33	D	A	T	F	R	H	
34	D	A	W	F	R	H	
35	D	A	Y	F	R	H	
36	D	A	V	F	R	H	
37	D	A	E	A	R	H	
38	D	A	E	R	R	H	
39	D	A	E	N	R	H	
40	D	A	E	D	R	H	
41	D	A	E	Q	R	H	
42	D	A	E	E	R	H	
43	D	A	E	G	R	H	
44	D	A	E	H	R	H	
45	D	A	E	I	R	H	
46	D	A	E	L	R	H	
47	D	A	E	M	R	H	
48	D	A	E	F	R	H	controlo positivo
49	D	A	E	P	R	H	
50	D	A	E	S	R	H	

Fig.1C

51	D	A	E	T	R	H	
52	D	A	E	W	R	H	
53	D	A	E	Y	R	H	
54	D	A	E	V	R	H	
55	D	A	E	F	A	H	
56	D	A	E	F	R	H	controlo positivo
57	D	A	E	F	N	H	
58	D	A	E	F	D	H	
59	D	A	E	F	Q	H	
60	D	A	E	F	E	H	
61	D	A	E	F	G	H	
62	D	A	E	F	H	H	
63	D	A	E	F	I	H	
64	D	A	E	F	L	H	
65	D	A	E	F	M	H	
66	D	A	E	F	F	H	
67	D	A	E	F	P	H	
68	D	A	E	F	S	H	
69	D	A	E	F	T	H	
70	D	A	E	F	W	H	
71	D	A	E	F	Y	H	
72	D	A	E	F	V	H	
73	D	A	E	F	R	A	
74	D	A	E	F	R	R	
75	D	A	E	F	R	N	
76	D	A	E	F	R	D	
77	D	A	E	F	R	Q	
78	D	A	E	F	R	E	
79	D	A	E	F	R	G	
80	D	A	E	F	R	H	controlo positivo
81	D	A	E	F	R	I	
82	D	A	E	F	R	L	
83	D	A	E	F	R	M	
84	D	A	E	F	R	F	
85	D	A	E	F	R	P	
86	D	A	E	F	R	S	
87	D	A	E	F	R	T	
88	D	A	E	F	R	W	
89	D	A	E	F	R	Y	
90	D	A	E	F	R	V	

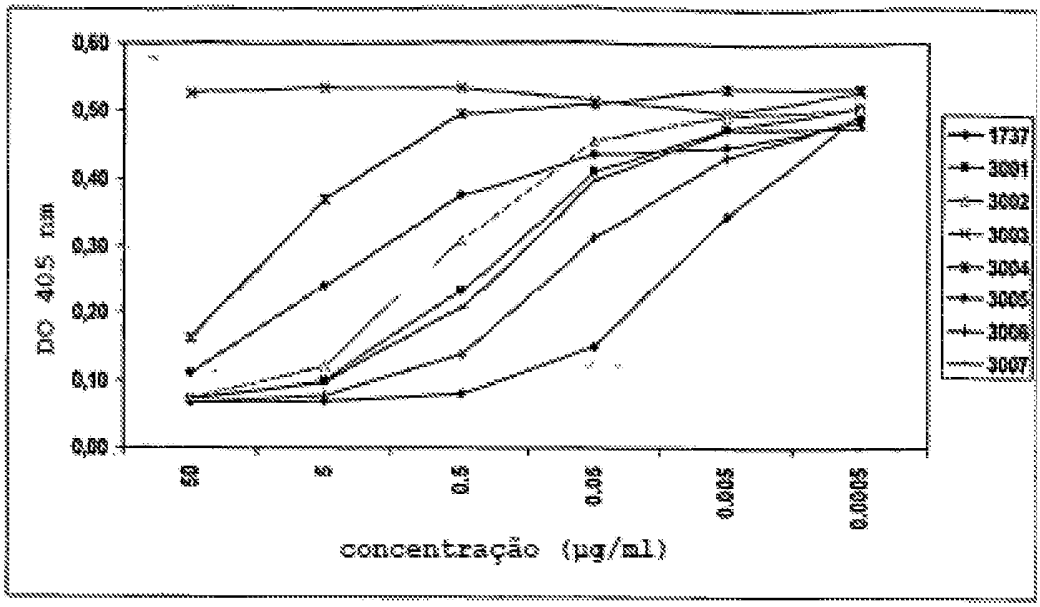

DO 405 nm
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
50
5
0,5
0,05
0,0005
0,00005
concentração (pg/ml)
1737
3001
3002
3003
3004
3005
3006
3007

Fig.2

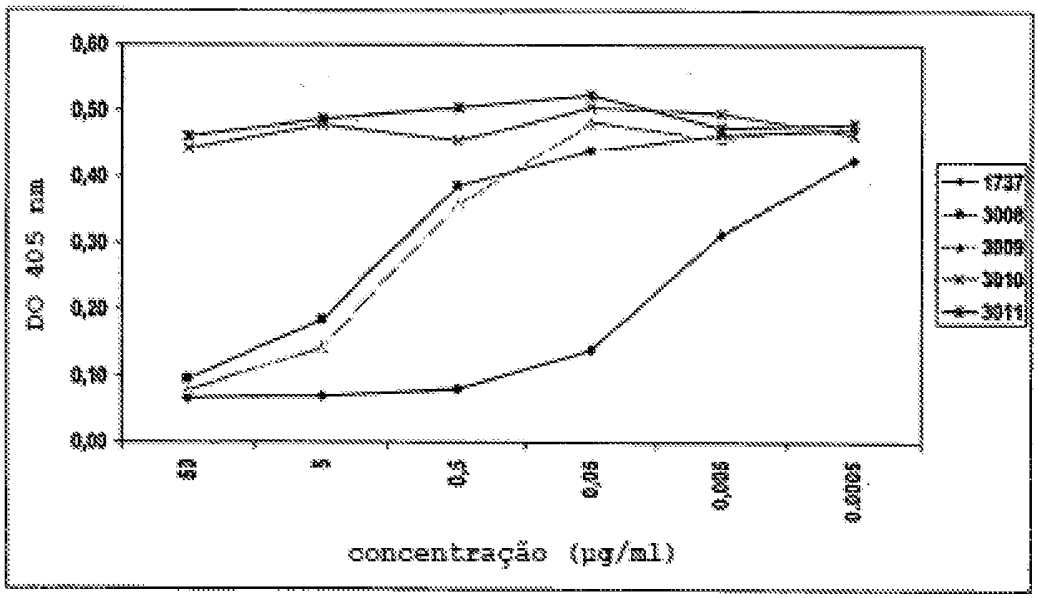

DO 405 nm
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
50
5
0,5
0,05
0,0005
0,00005
concentração (pg/ml)
1737
3008
3009
3010
3011

Fig.3

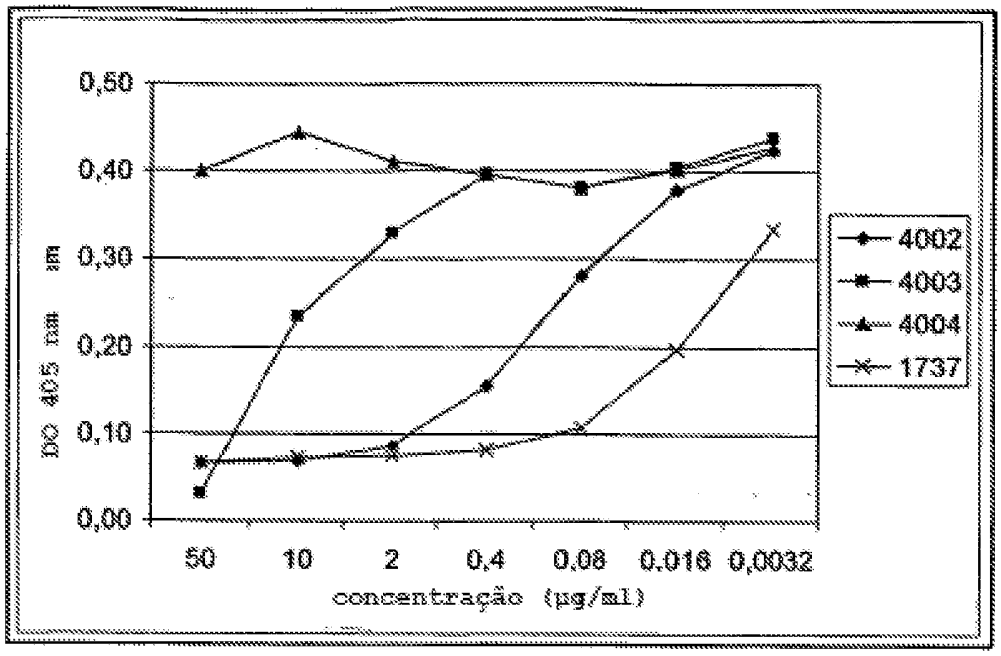

0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
DO 405 nm
50
10
2
0,4
0,08
0,016
0,0032
concentração (µg/ml)
4002
4003
4004
1737

Fig.4

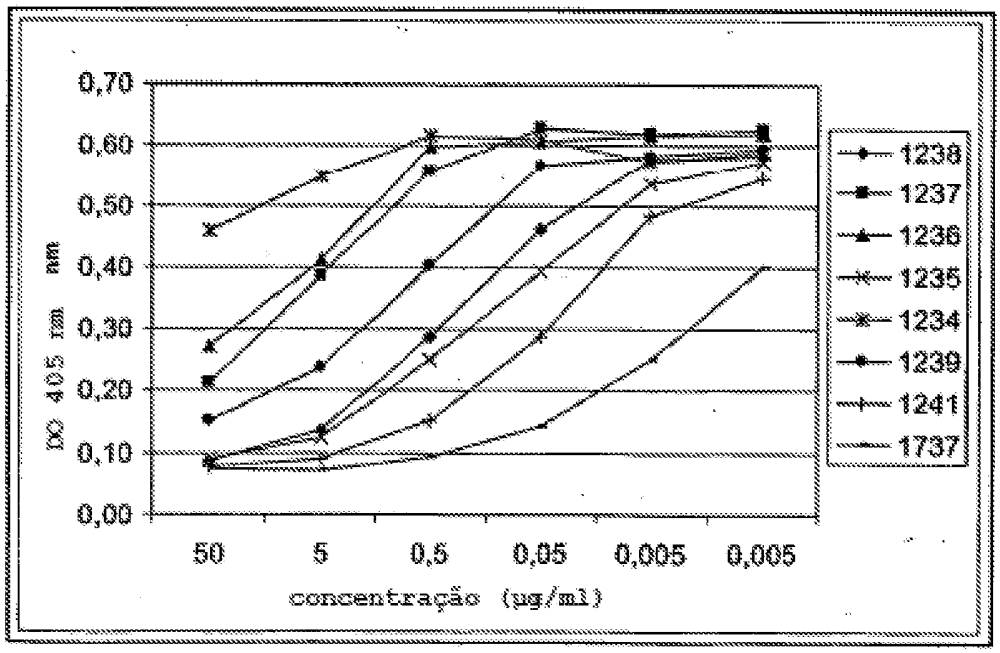

0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
DO 405 nm
50
5
0,5
0,05
0,005
0,005
concentração (µg/ml)
1238
1237
1236
1235
1234
1239
1241
1737

Fig.5

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

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

Documentos de patentes citadas na Descrição

- WO 0072880 A
- WO 0118169 A2
- WO 03020750 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- **Roher et al.** β-amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. *PNAS*, 1993, vol. 90, 10836
- **Games et al.** Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β-amyloid precursor protein. *Nature*, 1995, vol. 373, 523
- **Schenk et al.** Immunization with amyloid-β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*, 1999, vol. 400, 173
- **Bard et al.** Peripherally administered antibodies against amyloid β-peptides enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nature Med*, 2000, vol. 6, 916
- **Janus et al.** Aβ peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature*, 2000, vol. 408, 979
- **Editorial.** Insoluble problem?. *Nature Med*, 2002, vol. 8, 191
- **McLaurin et al.** Therapeutically effective antibodies against amyloid-β peptide target amyloid-β residues 4-10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis. *Nature Med*, 2002, vol. 8, 1263
- **Hock et al.** Generation of antibodies specific for β-amyloid by vaccination of patients with Alzheimer disease. *Nature Med*, 2002, vol. 8, 1270
- **Walsh et al.** Naturally secreted oligomers of amyloid B protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, 2002, vol. 416, 535
- **Reineke et al.** Identification of distinct antibody epitopes and mimotopes from a peptide array of 5520 randomly generated sequences. *J Immunol Methods*, 2002, vol. 267, 37
- **Johnson-Wood et al.** Amyloid precursor protein processing and Aβ42 deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *PNAS*, 1997, vol. 94, 1550
- **Bard et al.** Peripherally administered antibodies against amyloid β-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nature Med*, 2000, vol. 6, 916
- *Biol.Chem.*, vol. 358, 581
- **Singh et al.** *Nat. Biotech.*, 1999, vol. 17, 1075-1081
- **O'Hagan et al.** *Nature Reviews, Drug Discovery*, 2003, vol. 2 (9), 727-735