

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2007.01.30	(73) Titular(es): GRIFOLS THERAPEUTICS INC. 4101 RESEARCH COMMONS 79 T.W. ALEXANDER DRIVE RESEARCH TRIANGLE PARK, NC 27709	US
(30) Prioridade(s): 2006.01.30 US 763422 P		
(43) Data de publicação do pedido: 2008.10.22		
(45) Data e BPI da concessão: 2013.03.20 086/2013	(72) Inventor(es): PHILIP SCUDERI AFSHIN SAFAVI LANGEVIN, MATTHEW, G.	US US US
	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA	PT

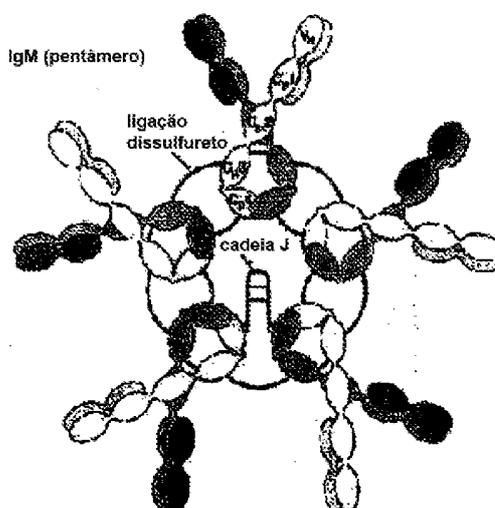
(54) Epígrafe: **MÉTODO DE TRATAMENTO E PROFILAXIA DE DOENÇAS RELACIONADAS COM A DEPOSIÇÃO DE AMILÓIDES UTILIZANDO IGM**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO REFERE-SE A UM MÉTODO DE TRATAMENTO OU PREVENÇÃO DE DOENÇAS ASSOCIADAS A POLIPÉPTIDOS -AMILÓIDES COMPREENDENDO A ADMINISTRAÇÃO DE UMA PREPARAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA ENRIQUECIDA EM IMUNOGLOBULINA M (IGM) E A COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO ESSAS PREPARAÇÕES.

RESUMO**"MÉTODO DE TRATAMENTO E PROFILAXIA DE DOENÇAS RELACIONADAS
COM A DEPOSIÇÃO DE AMILÓIDES UTILIZANDO IgM"**

A invenção refere-se a um método de tratamento ou prevenção de doenças associadas a polipéptidos β -amilóides compreendendo a administração de uma preparação de imunoglobulina enriquecida em imunoglobulina M (IgM) e a composições farmacêuticas compreendendo essas preparações.



DESCRIÇÃO

"MÉTODO DE TRATAMENTO E PROFILAXIA DE DOENÇAS RELACIONADAS COM A DEPOSIÇÃO DE AMILÓIDES UTILIZANDO IgM"

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Crê-se que o péptido amilóide β 1-42 ($A\beta$) é um dos factores chave no desenvolvimento e progressão da doença de Alzheimer. Embora o papel patogénico exacto do péptido amilóide β na doença de Alzheimer ainda não tenha sido definitivamente estabelecido, a evidência acumulada apoia a hipótese de que a produção e deposição no cérebro de péptido amilóide β é um evento causador da doença de Alzheimer. Por conseguinte, o problema da produção, acumulação e eliminação de péptido amilóide β no cérebro emergiu como uma das possíveis abordagens racionais para o tratamento da doença de Alzheimer.

Recentemente verificou-se que as preparações de IgG intravenosas contêm anticorpos específicos para o péptido amilóide $A\beta$ 1-42. Além disso, em dois pequenos ensaios clínicos humanos, verificou-se que a IgG intravenosa retarda a progressão da doença de Alzheimer (Dodel, R. *et al.*, "Intravenous Immunoglobulins containing antibodies against β -amyloid for the treatment of Alzheimer's disease", *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 75:1472-1414

(2004); e Dodel, R. *et al.*, "Human antibodies against amyloid beta peptide: A potential treatment for Alzheimer's disease", *Ann. Neurol.*, 52:253-256 (2002)). Embora o mecanismo de acção da IgG nesta indicação continue a não estar elucidado, os autores especularam que a simples remoção sistémica do péptido A β 1-42 ofensivo pode ser a razão da eficácia da IgG intravenosa.

O WO 03/097093 descreve a administração de IgM policlonal humana a doentes que sofrem de doenças mediadas pelo sistema imune incluindo asma, imunodeficiência comum variável, artrite reumatóide, lupus eritematoso sistémico, doença do soro e vasculite.

Levy *et al.* (2003) mencionam o tratamento de um doente com síndrome de Sjögren com pentaglobina.

A EP 1172378 discute a utilização de anticorpo IgG humano no tratamento da doença de Alzheimer.

A FR 2824568, a DE 9327112 e a EP 0835880 descrevem vários métodos para a preparação de preparações de IgM derivada de plasma humano.

A imunoglobulina M (IgM) é a imunoglobulina encontrada na terceira maior concentração no soro da maioria dos animais (cerca de 6-10% da combinação de imunoglobulinas totais). As concentrações plasmáticas normais de IgM em seres humanos são de cerca de 0,6 a cerca

de 2,5 mg/mL para os indivíduos do sexo masculino e de cerca de 0,7 a cerca de 2,8 mg/mL para os indivíduos do sexo feminino.

A IgM é uma molécula 19S com um peso molecular de 950 kDa e é constituída por cinco subunidades idênticas de 180 kDa. Cada uma destas subunidades é semelhante em estrutura ao monómero de IgG, excepto que possuem quatro, em vez de três, domínios C_H. Os monómeros de IgM estão ligados por ligações dissulfureto de uma forma circular para formar uma estrela, e um polipéptido pequeno rico em cisteína chamado cadeia J (20 kDa) liga duas das unidades (ver a Fig. 1). As moléculas de IgM são segregadas por plasmócitos intactos e a cadeia J tem portanto de ser considerada como sendo uma parte integrante desta molécula. A semi-vida plasmática da IgM é cerca de 5,1 dias.

A IgM é o principal isotipo de imunoglobulina produzido numa resposta imunitária primária. Também é produzido numa resposta secundária, mas isto tende a ser mascarado pela predominância da IgG. Embora produzida numa quantidade relativamente pequena, a IgM, devido à sua estrutura pentamérica, é consideravelmente mais eficiente (numa base molar) do que a IgG na activação do complemento, opsonização, neutralização de vírus e aglutinação. A maioria das isoaglutininas do soro humano, que reconhecem os antigénios do tipo de sangue A e B, são da classe da IgM. Portanto, pode ser utilizadas algumas medidas especiais durante a purificação para remover as isoaglutininas

e tornar a preparação mais compatível com os tipos de sangue A e B.

A imunização passiva utilizando preparações de imunoglobulinas contendo IgM pode proporcionar vantagens no tratamento e/ou prevenção de patologias ou doenças associadas a péptidos amilóides.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a uma preparação para utilização em métodos para o tratamento ou prevenção (incluindo qualquer diminuição clinicamente significativa dos sintomas ou abrandamento da progressão da doença, respectivamente) de doença neurodegenerativa associada a amilóides ou amiloidose. A invenção também se refere a preparações de imunoglobulinas úteis nesses métodos.

Por conseguinte, num aspecto, a invenção refere-se a uma preparação para utilização num método de tratamento ou prevenção de uma doença associada a polipéptidos β -amilóides que compreende a administração de uma preparação de imunoglobulina produzida a partir de amostras de plasma humano combinadas como material de partida, em que a preparação de imunoglobulina está enriquecida em imunoglobulina M (IgM). A preparação de imunoglobulina pode compreender pelo menos cerca de 80% de IgM ou pelo menos cerca de 90% de IgM. A preparação de imunoglobulina compreende anticorpos IgM que se ligam especificamente a

A β 1-42. A doença associada aos péptidos β -amilóides pode ser uma doença neurodegenerativa associada a amilóides. A doença pode ser doença de Alzheimer.

Em algumas formas de realização, a preparação de imunoglobulina pode ser administrada numa dosagem de imunoglobulina de cerca de 0,1 μ g por kg de peso corporal a cerca de 1000 mg por kg de peso corporal. A preparação de imunoglobulina também pode ser administrada numa dosagem de cerca de 0,5 μ g por kg de peso corporal a cerca de 500 mg por kg de peso corporal; de cerca de 0,5 μ g por kg de peso corporal a cerca de 100 mg por kg de peso corporal; ou de cerca de 5 μ g por kg de peso corporal a cerca de 50 mg por kg de peso corporal.

Noutro aspecto, a invenção refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo IgM, pelo menos uma porção da qual se liga especificamente a A β 1-42, em que a IgM pode ser preparada a partir de material de partida que compreende imunoglobulinas e outras substâncias por ajustamento do pH do material de partida de modo a formar uma solução intermédia que compreende imunoglobulinas dissolvidas, ajustamento da solução intermédia do passo a) a condições de pH, temperatura e concentração de caprilato tais que se formam um primeiro precipitado e um primeiro sobrenadante compreendendo imunoglobulinas, separação do primeiro sobrenadante do primeiro precipitado, incubação do primeiro sobrenadante em condições de tempo, pH, temperatura e concentração de caprilato tais que se formam

um segundo precipitado e um segundo sobrenadante compreendendo imunoglobulinas, separação do segundo sobrenadante do segundo precipitado, fazer contactar o segundo sobrenadante com uma primeira resina de permuta aniónica em condições de pH e força iónica tais que substancialmente nenhuma da imunoglobulina G ou imunoglobulina M está ligada à primeira resina mas imunoglobulina A e outras substâncias estão ligadas à primeira resina, separação de uma fracção contendo substancialmente toda a imunoglobulina G e imunoglobulina M do resultado do passo anterior, fazer contactar a imunoglobulina G e M com uma segunda resina de permuta aniónica em condições de pH e força iónica tais que substancialmente nenhuma da imunoglobulina G está ligada à segunda resina mas a imunoglobulina M e outras substâncias estão ligadas à segunda resina, eluição da IgM da coluna de segunda resina de permuta aniónica com uma solução tampoadada tendo uma condutividade na gama da que é encontrada numa solução de cloreto de sódio pelo menos 100 mM, aplicação da IgM numa resina de filtração de gel e recuperação da IgM aplicando a IgM numa resina de afinidade compreendendo antigénios A e B immobilizados, e recuperação da IgM. O material de partida pode ser derivado de produtos do sangue humano combinados. Os produtos do sangue humano combinados podem ser colhidos de doadores que não foram rastreados para determinar o seu título de imunoglobulina anti-A β .

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é um desenho esquemático que ilustra a

estrutura pentamérica global e as características das subunidades individuais.

A Figura 2 é um gráfico que ilustra a ligação de IgM a poços revestidos com A β 1-42, A β 22-35, inibidor de protease α -1 (α 1PI) e SUPERBLOCK.

A Figura 3 é um gráfico que ilustra a imunodepleção de IgM por pérolas acopladas a A β 1-42 testada numa placa revestida com A β 1-42 e α 1PI.

As Figuras 4A e 4B são gráficos que ilustram a inibição da ligação de IgM a placas revestidas com A β por vários péptidos relacionados e não relacionados com A β .

A Figura 5 é um gráfico que ilustra a inibição da ligação de IgM a placas revestidas com A β por GAMUNEX competitivo.

A Figura 6 é um desenho esquemático que ilustra métodos de fragmentação de IgM.

A Figura 7 é uma fotografia que mostra os resultados da electroforese em gel de IgM fragmentada por 2-mercaptoetilamina (MEA).

A Figura 8 é um gráfico que ilustra a ligação de IgM fragmentado por MEA a poços revestidos com A β 1-42.

A Figura 9 é um gráfico que ilustra a ligação de IgM a placas revestidas com A β 1-40, A β 1-42, A β 1-43 e α 1PI.

A Figura 10 é um gráfico que ilustra a ligação de IgM a placas revestidas com A β 1-42 na presença de A β 1-40, A β 1-42 e A β 1-43 competitivos

A Figura 11 é um gráfico que ilustra a ligação de IgM a placas revestidas com A β 1-42 na presença de A β 1-40, A β 1-42, A β 33-42 e A β 37-42 competitivos.

A Figura 12 é um gráfico que ilustra a ligação de IgM a placas revestidas com A β 1-42 na presença de A β 1-42 competitiva e A β 1-42 desordenada.

A Figura 13 é um gráfico que ilustra um perfil cromatográfico de uma preparação de IgM da invenção.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DE FORMAS DE REALIZAÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se à constatação de que preparações de imunoglobulinas contendo IgM derivadas de plasma humano combinado compreendem IgM que se liga especificamente a péptidos β amilóides. Em certos aspectos, a invenção proporciona preparações de imunoglobulinas e métodos úteis para o tratamento e/ou profilaxia de doenças e patologias associadas à amiloidose, incluindo a doença de Alzheimer.

As composições e métodos "compreendendo" um ou mais elementos enunciados podem incluir outros elementos não especificamente enunciados. Por exemplo, uma composição que compreende IgM podem englobar imunoglobulinas de outros tipos e pode incluir outras substâncias proteicas e não proteicas.

Tal como aqui utilizado, o termo "cerca de" ou "aproximadamente" significa que um valor pode cair dentro de uma gama cientificamente aceitável para esse tipo de valor, o que também vai depender da forma como pode ser conseguida uma medição quantitativa do valor tendo em conta os instrumentos de medição disponíveis.

Os termos "anticorpo" e "imunoglobulina" são aqui utilizados indiferentemente salvo se que expressamente indicado em contrário.

Doenças e patologias associadas a amiloidose

Uma doença ou patologia neurodegenerativa está associada a amiloidose quando os depósitos de amilóide ou placas amilóides são encontradas nos ou na proximidade dos tecidos afectados pela doença, ou quando a doença é caracterizada por sobreprodução de uma proteína, particularmente de uma proteína amilóide, que é ou se pode tornar insolúvel. As placas amilóides podem provocar efeitos patológicos directamente ou indirectamente por mecanismos

conhecidos ou desconhecidos. Exemplos de doenças amilóides incluem, mas não estão limitados a doenças sistêmicas, como doenças inflamatórias crônicas, mieloma múltiplo, macroglobulinemia, polineuropatia amilóide familiar (portuguesa) e cardiomiopatia amilóide familiar (dinamarquesa), amiloidose sistêmica senil, polinefropatia amilóide familiar (Iowa), amiloidose familiar (finlandesa), síndrome de Gerstmann-StrausslerScheinker, nefropatia amilóide familiar com urticária e surdez (síndrome de Muckle-Wells), carcinoma medular da tiróide, amilóide atrial isolado e amiloidose associada a hemodiálise (HAA) e doenças neurodegenerativas associadas a amilóides.

Como referido acima, além da amiloidose sistêmica, a presente invenção refere-se particularmente a doenças neurodegenerativas envolvendo amiloidose. A expressão "doença neurodegenerativa" refere-se a uma doença ou patologia do sistema nervoso, particularmente envolvendo o cérebro, que se manifesta com sintomas característicos de disfunção cerebral ou nervosa, por exemplo, lapsos ou deficiências da memória recente ou de longo prazo, demência, deficiências da cognição, problemas de equilíbrio e coordenação e deficiências emocionais e comportamentais. Essas doenças estão "associada a amiloidose" quando amostras histopatológicas (biópsias) de tecido cerebral de indivíduos que demonstram esses sintomas revelam a formação de placas amilóides. Dado que as amostras de biópsias do cérebro, especialmente do cérebro humano, são obtidas com grande dificuldade de indivíduos vivos ou podem não estar

de todo disponíveis, a associação de um sintoma ou sintomas de doença neurodegenerativa a amiloidose baseia-se frequentemente noutros critérios que não a presença de depósitos amilóides numa amostra de biópsia. Assim, especialmente em relação à doença de Alzheimer (AD), o diagnóstico tradicional depende da sintomatologia e, se relevante, na história familiar. Na prática clínica, um médico irá diagnosticar AD com base nos sintomas de demência senil, incluindo disfunção cognitiva, amnésia retrógrada (perda de memória de eventos recentes), deterioração progressiva da memória remota e, possivelmente, depressão ou outras síndromes neuróticas. O indivíduo apresenta desintegração lenta da personalidade e do intelecto. A imagiologia pode revelar grande perda de células do córtex cerebral e outras áreas do cérebro. A AD difere da demência senil, no entanto, pela idade de início: é provável que a AD ocorra na quinta ou sexta década, ao passo que a demência senil ocorre na oitava década ou mais tarde.

Numa forma de realização específica de acordo com a presente invenção, a doença neurodegenerativa associada a amiloidose é AD, uma doença que inclui AD esporádica, AD relacionada com ApoE4, outras formas mutantes de APP de AD (e.g., mutações em APP717, que são as mutações mais comuns de APP), formas mutantes de PS1 de AD familiar (FAD) (ver WO 96/34099), formas mutantes de PS2 de FAD (ver WO 97/27296) e AD relacionada com polimorfismo de α -2-macroglobulina. Noutras formas de realização, a doença pode

ser a doença sueca rara caracterizada por uma mutação dupla de KM a NL na proteína precursora de amilóide (APP) próximo do terminal amino da unidade β AP de APP (Levy et al., *Science* 248:1124-26 (1990)). Outra dessas doenças é a hemorragia cerebral hereditária com amiloidose (HCHA ou HCHWA) do tipo holandês (Rozemuller et al., *Am. J. Pathol.* 142:1449-57 (1993); Roos et al., *Ann. NY. Acad. Sci.* 640:155-60 (1991); Timmers et al., *Neurosci. Lett.* 118:223-6 (1990); Haan et al., *Arch. Neurol.* 47:965-7 (1990)). Outras dessas doenças conhecidas na arte e no âmbito da presente invenção incluem, mas não estão limitados a angiopatia amilóide cerebral esporádica, angiopatia amilóide cerebral hereditária, síndrome de Down, demência de Parkinson de Guam e angiopatia amilóide assintomática relacionada com a idade (ver, e.g., Haan e Roos, *Clin. Neurol. Neurosurg.* 92:305-310 (1990); Glenner e Murphy, *N. Neurol Sci.* 94:1-28 (1989); Frangione, *Ann. Med.* 21:69-12 (1989); Haan et al., *Clin. Neuro. Neurosurg.* 94:317-8 (1992); Fraser et al., *Biochem.* 37:10716-23 (1992); Coria et al., *Lab. Invest.* 55:454-8 (1988)). A verdadeira composição de aminoácidos e o tamanho do β AP (péptido beta-amilóide) envolvido em cada uma destas doenças pode variar, como é conhecido na arte (ver acima, e Wisniewski et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179:1247-54 (1991) e *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180:1528 (1991) [errata publicada]; Prelli et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 770:301-307 (1990); Levy et al., *Science* 248:1124-26 (1990)).

Amilóide

Os termos "amilóide", "placa amilóide" e "fibrila amilóide" refere-se genericamente a substâncias proteicas insolúveis com características físicas específicas independentes da composição de proteínas ou outras moléculas que são encontradas na substância. O amilóide pode ser identificado pela sua estrutura amorfa, coloração eosinófila, alterações na fluorescência com tioflavina e aparência homogênea. Os componentes proteicos ou peptídicos do amilóide são aqui designados "polipéptidos amilóides" e incluem, mas não estão limitados ao péptido β -amilóide ($A\beta$), incluindo β APs sintéticos correspondentes aos primeiros 28, 40 ou 42 aminoácidos de $A\beta$, *i.e.*, $A\beta$ 1-28, $A\beta$ 1-40, $A\beta$ 1-42, respectivamente, bem como um β AP sintético correspondente aos aminoácidos 25-35 de β , *i.e.*, $A\beta$ 25-35. Outros péptidos amilóides incluem proteína precursora do tremor epizoótico ou proteína do prião (associada à doença de Creutzfeldt-Jacob); sinucleína (associada à doença de Parkinson), proteína de Huntington (associada à coreia de Huntington), imunoglobulina, incluindo as cadeias leves e pesadas κ ou λ , ou os seus fragmentos, produzidos por mielomas; amilóide sérico A; β 2-microglobulina; ApoAI; gel-solina; cistatina C; (pro)calcitonina; factor natriurético atrial; polipéptido amilóide das ilhotas, também conhecido como amilina (ver Westermark *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54:3881-85, 1987; Westermark *et al.*, *Am. J. Physiol.* 727:414-417, 1987; Cooper *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54:8628-32, 1987; Cooper *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA 55:7763-66, 1988; Amiel, *Lancet* 341:1249-50, 1993); e outros semelhantes. Num aspecto específico, o termo "amilóide" é aqui utilizado para se referir a substâncias que contêm A β . "Amiloidose" refere-se à deposição ou agregação *in vivo* de proteínas para formar placas ou fibrilas amilóides.

O péptido β -amilóide com 42 aminoácidos (4,2 kDa) (A β 1-42 ou β AP) deriva de uma família maior de proteínas precursoras de péptido amilóide (APP) (Glennner e Wong, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 720:885-890 (1984); Glennner e Wong, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122:1131-35 (1984); Goldgaber *et al.*, *Science* 235:8778-8780 (1987); Kang *et al.*, *Nature* 325:733-736 (1987); Robakis *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4190-4194 (1987); Tanzi *et al.*, *Science* 235:880-884 (1987)). A APP 25 é uma proteína transmembranar encontrada em diversas isoformas, que em geral são aqui referidas como APP de comprimento total (flAPP). Além disso, existe uma forma solúvel da APP (sAPP α), formada pela acção de α -secretase.

O "nível de A β " numa amostra biológica pode ser detectado por qualquer método conhecido na arte, incluindo por não limitado a imunoensaio, análise bioquímica (e.g., purificação, electroforese em gel, análise quantitativa de sequências de aminoácidos ou análise da composição, coloração com vermelho do Congo ou tioflavina T, e outros semelhantes) ou outros métodos conhecidos para detectar A β . Em particular, os métodos de fluorescência utilizando

tioflavina T são usados para detectar péptido agregado. Uma "amostra biológica" inclui, mas não está limitada a fluidos corporais (sangue, células sanguíneas, plasma, soro, fluido cerebrospinal, urina), tecidos (e.g., medula espinal, nervos, etc.) ou órgãos (preferencialmente cérebro, mas incluindo também fígado, rim, pâncreas, etc.)

Os ensaios de anticorpo anti- β -amilóide podem ser realizados por técnicas conhecidas na arte, e.g., radioimunoensaio, ELISA (ensaio de imunoadsorção enzimática), imunoenaios em "sandwich", ensaios imunorradiométricos, reacções de precipitação de difusão em gel, ensaios de imunodifusão, imunoenaios *in situ* (utilizando ouro coloidal, marcadores enzimáticos ou de radioisótopos, por exemplo), transferências Western, reacções de precipitação, ensaios de aglutinação (por exemplo, ensaios de aglutinação (e.g., ensaios de aglutinação em gel, ensaios de hemaglutinação), ensaios de fixação do complemento, ensaios de imunofluorescência, ensaios de proteína A e ensaios de imuno-electroforese, etc. Numa forma de realização, a ligação do anticorpo é detectada por detecção um marcador no anticorpo primário. Noutra forma de realização, o anticorpo primário é detectado por detecção da ligação de um anticorpo secundário ou reagente ao anticorpo primário. Numa outra forma de realização, o anticorpo secundário está marcado. Na arte são conhecidos muitos meios para detectar a ligação num imunoensaio e estão dentro do âmbito da presente invenção. Por exemplo, para seleccionar anticorpos que reconhecem um epitopo específico de um péptido amilóide, pode testar-se

hibridomas gerados para um produto que se liga a um fragmento de péptido amilóide contendo esse epitopo.

Preparações de imunoglobulina

A presente invenção refere-se à constatação de que a IgM purificada de fontes humanas doadas, reunidas, apresenta especificidade para um péptido A β 1-42. Num aspecto, as preparações de imunoglobulina contendo IgM podem ser preparadas de acordo com a patente U.S. N° 6307028 de Lebing *et al.*

Lebing *et al.* descrevem um processo para a preparação de IVIG que inclui um passo cromatográfico de permuta aniónica, em que esta resina retém a maioria da IgM dos materiais de partida. De acordo com a presente invenção, a IgM é eluída desta resina de permuta aniónica e submetida a filtração em gel, seguida por remoção de isoaglutinina por passagem da preparação através de uma resina compreendendo antigénio A e B sintético imobilizado.

A oligomerização de IgM é reduzida por processamento a baixas concentrações, a pH relativamente baixo, e por minimização da exposição de IgM a elevado teor de sal. As preparações finais são formuladas em 0,2 M de glicina (pH 4,2) para evitar mais oligomerização. Mais pormenores sobre a preparação de IgM de acordo com a invenção estão apresentados no Exemplo 1 adiante. No entanto, deve ser reconhecido que os exemplos específicos aqui apresentados

são apenas ilustrativos da invenção, e nenhum se destina a ser limitativo do âmbito da invenção tal como reivindicada.

Ligação a péptido A β

Para determinar a ligação de IgM a péptidos A β , foi desenvolvido um ensaio ELISA para quantificar anti-A β 1-42 na combinação de IgM. Neste ensaio, uma placa de microtitulação foi revestida com péptido A β 1-42 sintético, a sua versão abreviada A β 22-35, bem como uma proteína irrelevante inibidora de protease α 1, e concentrações variáveis de IgM derivada de plasma reunido foram adicionadas à placa. A IgM ligado foi detectada utilizando conjugado de anti-IgM humana de cabra com peroxidase de rábano. a IgM demonstrou uma ligação elevada e saturada ao péptido amilóide de tamanho completo (Fig. 2), enquanto que foi detectada muito pouca ou nenhuma ligação ao péptido truncado ou inibidor de protease α 1.

De modo a testar se a ligação observada era específica, foi realizada uma experiência de controlo em que a preparação de IgM foi incubada de um dia para o outro com pérolas de SEPHAROSE covalentemente revestidas com péptido A β 1-42. Como um controlo negativo, a preparação de IgM também foi incubada nas mesmas condições com pérolas de SEPHAROSE não revestidas. O material imunodeprimido foi testado quanto à ligação a A β 1-42. A preparação de IgM incubada com pérolas de SEPHAROSE não revestidas apresentou boa ligação em poços revestidos com A β 1-42 e nenhuma

ligação em poços revestidos com α 1PI. No entanto, a IgM incubada com pérolas revestidas com A β 1-42 apresentou muito pouca ligação a poços revestidos com A β 1-42 (Fig. 3), indicando que a ligação de IgM a péptido amilóide A β 1-42 é específica.

Para confirmar ainda que a ligação de IgM a péptido A β 1-42 é específica, foi realizada uma série de experiências de competição de péptidos para procurar inibições do sinal de ELISA. Concentrações variadas de um A β 1-42 livre e dos seus derivados mais pequenos (A β 22-35, 1-40, 1-28, 25-35) e uma proteína não relacionada, α 1PI, foram pré-incubadas com 0,1 mg/mL de IgM durante 1 hora e depois adicionadas a placas revestidas com A β 1-42. O péptido A β de comprimento total foi o único competidor capaz de bloquear a ligação de IgM à placa (Fig. 4A e 4B). Este efeito era dependente da concentração com 0,1 mg/mL de péptido A β 1-42 livre a ser capaz de inibir completamente a ligação de IgM à placa de ELISA.

Nenhuns dos derivados do péptido A β 1-42, como A β 1-28, A β 25-35 ou até o péptido A β 1-40, foram capazes de competir para a ligação de IgM. Sem pretender ficar limitados por qualquer teoria em particular, estes resultados podem indicar que ou: 1) as IgMs contra A β 1-42 requerem que o péptido esteja numa conformação específica, ou 2) que o sítio de reconhecimento de epitopos esteja na porção C terminal do péptido.

Para avaliar melhor a especificidade e ligação da *pool* de IgM humana, foi montada uma experiência de competição entre a *pool* de IgG humana (GAMUNEX, Talecris Biotherapeutics, Research Triangle Park, NC) e a *pool* de IgM. Foram preparadas várias diluições de GAMUNEX e misturadas com 0,1 mg/mL de IgM. Em seguida, estas misturas foram adicionadas a uma placa revestida com A β 1-42. 4 mg/mL de GAMUNEX eliminaram completamente a ligação de IgM (Fig. 5). Esta experiência sugere que a *pool* de IgM pode partilhar alguns epitopos comuns com as IgGs encontradas no plasma contra A β 1-42. A série de experiências de inibição, combinada com os dados de imunodepleção, confirmam a ligação de IgM ao péptido β -amilóide A β 1-42, e que a ligação é específica.

Além disso, fragmentos de IgM gerados utilizando 2-mercaptoetilamina (MEA - ver Fig. 6 e Exemplo 6 adiante) foram testados quanto à ligação a péptidos A β 1-42. Os fragmentos de IgM recém gerados foram diluídos e adicionados a poços revestidos com A β 1-42 e α 1PI para testar quanto à ligação e especificidade. Os fragmentos do tipo IgG retiveram as suas características de ligação e especificidade, semelhantes à IgM pentomérica (ver Fig. 8).

A constatação de que contém IgM reunida contém anticorpo contra péptido β -amilóide A β 1-42 indica que esta imunoglobulina pode ser útil para a gestão da doença de Alzheimer. A IgM administrada intravenosamente pode ser utilizada profilacticamente, em indivíduos susceptíveis à

doença de Alzheimer, ou para o tratamento de doentes diagnosticados com doença de Alzheimer. Além disso, IgM monomérica (produzida como resultado da redução suave de dissulfuretos que ligam todas as cinco subunidades à cadeia J), ou os derivados de baixo peso molecular de IgM (por exemplo, fragmentos proteolíticos da IgM) também podem ser utilizados para a gestão da doença de Alzheimer. De facto, fragmentos mais pequenos de IgM pode passar a barreira hemato-encefálica mais eficientemente e, por conseguinte, ser mais potentes do que a IgM de comprimento total. Esses derivados de IgM podem ser testados de acordo com os métodos e procedimentos aqui descritos para retenção de ligação e selectividade para os péptidos A β 1-42 e péptidos A β relacionados.

O termo "doente" inclui seres humanos e outros indivíduos mamíferos que recebem tratamento profilático ou terapêutico.

Composições farmacêuticas e administração

Os indivíduos com níveis normais de anticorpos anti-amilóide parecem estar protegidos de doença neurodegenerativa. No entanto, ensaios clínicos de uma vacina de péptido A β 1-42 resultou em inflamação do cérebro em diversos doentes. Consequentemente, a administração de anticorpos anti-amilóide naturais, *i.e.* imunização passiva, a indivíduos em risco de ou que sofrem de uma doença neurodegenerativa, *e.g.*, AD, tem um maior potencial de

segurança bem como de eficácia. Preparações de imunoglobulinas compreendendo IgM anti-A β de acordo com a presente invenção podem ser uma alternativa mais segura quando utilizadas para a imunização passiva de pessoas que sofrem de, ou estão em risco de desenvolvimento de doença relacionada com amilóide.

As preparações de imunoglobulina peptídicas anti-amilóides da invenção podem ser formuladas numa composição farmacêutica com um veículo farmacêuticamente aceitável. A frase "farmacêuticamente aceitável" refere-se a entidades moleculares e composições que são fisiologicamente toleráveis e que tipicamente não produzem uma reacção alérgica ou inconveniente semelhante, como perturbação gástrica, tonturas e outras semelhantes, quando administradas a um ser humano. Tal como aqui utilizado, o termo "farmacêuticamente aceitável" pode significar aprovado por uma agência reguladora do Governo Federal ou de um governo estatal ou listado na Farmacopeia dos EUA ou outra farmacopeia genericamente reconhecida para utilização em animais, e mais particularmente em seres humanos. O termo "veículo" refere-se a um diluente, adjuvante, excipiente ou veículo com o qual o composto é administrado. Esses veículos farmacêuticos podem ser líquidos estéreis, tais como água e óleos, incluindo os de petróleo, de origem animal, vegetal ou sintética, como óleo de amendoim, óleo de soja, óleo mineral, óleo de sésamo e outros semelhantes. Água ou soluções aquosas de soro fisiológico ou dextrose aquosa ou soluções de glicerol são preferencialmente utilizadas como

veículos, particularmente para soluções injectáveis. Veículos farmacêuticos apropriados estão descritos em "Remington Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin.

As composições farmacêuticas compreendendo as preparações de imunoglobulina anti-amilóide da invenção podem ser introduzidas parentericamente, transmucosalmente, e.g. oralmente (*per os*), nasalmente, ou rectalmente, ou transdermicamente. Vias parentéricas incluem administração intravenosa, intra-arteriolar, intramuscular, intradérmica, subcutânea, intraperitoneal, intraventricular e intracraniana. A administração pode ser directamente no fluido cerebrospinal, e.g., por uma punção lombar.

Noutras formas de realização, as preparações da invenção podem ser administradas numa vesícula, em particular num lipossoma (ver Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat *et al.*, in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein e Fidler (eds.), Liss: New York, páginas 353-365 (1989), Lopez-Berestein, *ibid.*, páginas 317-327; ver genericamente *ibid.*).

Ainda noutra forma de realização, as preparações da invenção podem ser administradas num sistema de libertação controlada. Por exemplo, um polipéptido pode ser administrado utilizando perfusão intravenosa com uma bomba contínua, numa matriz de polímero como ácido poli-láctico/glutâmico (PLGA), uma pastilha contendo uma mistura de

colesterol e o composto anticorpo anti-péptido amilóide (SILASTICR, Dow Corning, Midland, Mich.; ver patente US N° 5554601) implantada subcutaneamente, uma bomba osmótica implantável, um adesivo transdérmico, lipossomas ou outros modos de administração. Numa forma de realização, pode ser utilizada uma bomba (ver Langer (1990); Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88:507 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989)). Noutra forma de realização, podem ser utilizados materiais poliméricos (ver *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Press: Boca Raton, Fla. (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley: N. Y. (1984); Ranger e Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61 (1983); ver também Levy et al., *Science* 228:190 (1985), During et al., *Ann. Neurol.* 25:351 (1989); Howard et al., *J. Neurosurg.* 77:105 (1989)). Ainda numa outra forma de realização, um sistema de libertação controlada pode ser colocado na proximidade do alvo terapêutico, i.e., o cérebro, requerendo assim só uma fracção da dose sistémica (ver, e.g., Goodson, em *Medical Applications of Controlled Release*, vol. 2, páginas 115-138 (1984)). Um dispositivo de libertação controlada pode ser introduzido num indivíduo na proximidade do sítio de amiloidose. Sistemas de libertação controlada estão discutidos na revisão por Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)).

As preparações de imunoglobulinas e os métodos da invenção são úteis para o tratamento de doenças neurológicas ou de doenças associadas a uma deficiência de

anticorpos anti-amilóide. Assim, uma doença ou patologia sujeita a tratamento ou prevenção de acordo com a invenção pode ser uma neuropatia envolvendo a deposição de amilóide, e pode estar associada a imunodeficiência específica ou geral. Estas doenças incluem, mas não estão limitadas a AD; Kuru, doença Creuzdfelt-Jacob e outras encefalopatias espongiiformes; doença de Parkinson; e coreia de Huntington.

Regime de dosagem

Um fornecimento *in vivo* constante dos anticorpos anti-péptido amilóide das preparações de imunoglobulina da invenção pode ser assegurado proporcionando uma dose terapêuticamente eficaz (*i.e.*, uma dose eficaz para induzir alterações metabólicas num indivíduo) nos intervalos de tempo necessários, *e.g.*, diariamente, de 12 em 12 horas, etc. Estes parâmetros vão depender da gravidade da doença ou patologia a ser tratada, de outras acções, como modificações da dieta que são implementadas, o peso, idade e sexo do indivíduo, e de outros critérios, que podem ser prontamente determinados de acordo com a boa prática médica corrente pelos peritos na matéria. A preparação de imunoglobulina anti-péptido amilóide é administrada durante pelo menos dez dias, pelo menos 100 dias, ou durante a vida de quem a recebe.

O termo "prevenir" significa interferir profilaticamente com um mecanismo patológico que resulta na doença ou patologia, resultando em pelo menos uma diminuição clinicamente reconhecível da velocidade de deterioração ou

da extensão final dos danos pela doença. No contexto da presente invenção, esse mecanismo patológico pode ser um aumento do processamento da forma amiloidogénica de APP; desregulação da eliminação de A β ou alguma combinação dos dois.

O termo "tratar" significa causar um melhoramento num estado associado à doença ou patologia. No contexto da presente invenção, tratamento inclui uma redução do nível de A β , regulação da formação de A β , diminuição da agregação de A β ou a formação de placas amilóides, ou melhoramento de um defeito cognitivo num indivíduo que sofre de uma doença ou patologia associada a amiloidose, *e.g.*, AD ou um modelo animal de AD. Uma "quantidade terapêuticamente eficaz" das preparações de imunoglobulinas da invenção pode tratar ou prevenir um défice clinicamente significativo da actividade, função e a resposta do hospedeiro. Alternativamente, uma quantidade terapêuticamente eficaz pode ser suficiente para causar um melhoramento clinicamente significativo de um estado de doença no hospedeiro.

Um indivíduo que "tem um risco aumentado de desenvolvimento" de uma doença ou patologia neurológica associada a amiloidose pode ter uma predisposição genética para o desenvolvimento de uma amiloidose, como uma pessoa de uma família que tem membros com AD familiar (FAD). Alternativamente, alguém em sua sétima ou oitava década está em maior risco de AD relacionada com a idade.

Um sujeito que "apresenta um sintoma de" uma

doença ou patologia neurológica associada a amiloidose apresenta um sintoma ou queixa encontrada em indivíduos que têm ou tiveram essa doença ou patologia. Por exemplo, na AD, estes sintomas podem incluir o desenvolvimento de demência, defeitos de memória e outros semelhantes na quinta e sexta década, como discutido acima.

Uma "dose redutora do nível de $A\beta$ " é uma quantidade de anticorpo anti-péptido amilóide que causa uma diminuição do nível de $A\beta$, e.g., no cérebro ou fluido espinal de um doente tratado. As dosagens podem variar de cerca de 0,1 μg de anticorpo anti-péptido amilóide por kg de peso corporal ($\mu\text{g}/\text{kg}$) a cerca de 100 mg/kg; 0,5 μg de anticorpo anti-péptido amilóide por kg de peso corporal ($\mu\text{g}/\text{kg}$) a cerca de 50 mg/kg; ou de cerca de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ até cerca de 10 mg/kg. A quantidade de anticorpo anti-péptido amilóide utilizada para diminuir o nível de $A\beta$ pode ser uma quantidade correspondente ao nível de anticorpo anti-péptido amilóide numa amostra biológica, especialmente sangue (incluindo plasma e soro) e fluido cerebrospinal (CSF) de um indivíduo normal.

"Reduzir o nível de péptidos amilóides β ($A\beta$)" pode referir-se diminuir a quantidade de $A\beta$ 1-42 *in vivo*. $A\beta$ pode acumular-se no sangue, fluido cerebrospinal ou órgãos. O primeiro órgão de interesse para reduzir o nível de $A\beta$ é o cérebro, mas os níveis de $A\beta$ também pode ser reduzidos nos fluidos corporais, tecidos e/ou outros órgãos pela prática desta invenção.

As doses eficazes das composições da presente invenção, para o tratamento das patologias acima descritas variam dependendo de muitos factores diferentes, incluindo meios de administração, sítio alvo, estado fisiológico do doente, se o doente é um ser humano ou um animal, outros medicamentos administrados e se o tratamento é profiláctico ou terapêutico. As dosagens de tratamento podem ser tituladas para otimizar a segurança e a eficácia.

Para imunização passiva com uma preparação de anticorpo ou imunoglobulina, a dosagem varia de cerca de 0,0001 a 2000 mg/kg, 200 a 1000 mg/kg, e mais usualmente 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal do hospedeiro. Por exemplo, as dosagens podem ser de 100 mg/kg de peso corporal ou 1000 mg/kg de peso corporal, ou dentro da gama de 100-1000 mg/kg. Um regime de tratamento exemplificativo implica a administração uma vez em cada duas semanas ou uma vez por mês ou uma vez a cada 3 a 6 meses. Os anticorpos são normalmente administrados em múltiplas ocasiões. Os intervalos entre doses individuais podem ser semanais, mensais ou anuais. Os intervalos também podem ser irregulares como indicado pela medição dos níveis sanguíneos de anticorpo para A β no doente. Em alguns métodos, a dose é ajustada para se obter uma concentração plasmática de anticorpo de 1-50 mg/mL e em alguns métodos de 1-20 mg/mL. Alternativamente, os anticorpos podem ser administrados como uma formulação de libertação prolongada, caso em que é necessária uma administração menos frequente. A dosagem e a frequência variam dependendo da semi-vida dos anticorpos no doente.

A dosagem e frequência de administração podem variar dependendo se o tratamento é profilático ou terapêutico. Em aplicações profiláticas, uma dosagem relativamente baixa é administrada a intervalos relativamente pouco frequentes durante um período de tempo longo. Alguns doentes continuam a receber tratamento para o resto de suas vidas. Em aplicações terapêuticas, uma dosagem relativamente elevada a intervalos relativamente curtos é por vezes necessária até a progressão da doença ser reduzida ou terminada, e preferencialmente até o doente apresentar melhora-mento parcial ou completo dos sintomas da doença. Depois disso, pode administrar-se um regime profilático ao doente.

Os agentes da invenção podem opcionalmente ser administrados em associação com outros agentes que são pelo menos parcialmente eficazes no tratamento de doença amiloidogénica. No caso da AD e síndrome de Down, em que os depósitos amilóides ocorrem no cérebro, os agentes da invenção também podem ser administrados em conjunto com outros agentes que aumentam a passagem dos agentes da invenção através da barreira hemato-cerebral.

Imunização passiva

Em geral, os procedimentos para monitorização da imunização passiva são semelhantes aos que podem ser utilizados para monitorizar a imunização activa. No entanto, o perfil de anticorpos após a imunização passiva tipicamente apresenta um pico imediato na concentração de

anticorpos seguido por um decaimento exponencial. Sem uma dosagem adicional, o decaimento aproxima-se dos níveis de pré-tratamento dentro de um período de dias a meses dependendo da semi-vida do anticorpo administrado. Por exemplo, a semi-vida de alguns anticorpos humanos é da ordem de 20 dias.

Em alguns métodos, uma medição da linha de base de anticorpo para $A\beta$ no doente pode ser feita antes da administração, uma segunda medição pode ser feita logo a seguir para determinar o nível de anticorpos de pico, e uma ou mais outras medições são feitas a intervalos para monitorizar o decaimento dos níveis de anticorpos. Quando o nível de anticorpos diminuiu até à linha de base ou uma percentagem pré-determinada do pico menos a linha de base (por exemplo, 50%, 25% ou 10%), é administrada uma dosagem adicional de anticorpo. Em alguns métodos, os níveis de pico ou níveis medidos subsequentemente menos o fundo podem ser comparados com níveis de referência previamente determinados para constituir um regime de tratamento profilático ou terapêutico vantajoso noutros doentes. Se o nível de anticorpo medido for significativamente inferior a um nível de referência (e.g., menos do que a média menos um desvio padrão do valor de referência da população de doentes que beneficiam do tratamento), pode estar indicada a administração de uma dosagem adicional de anticorpo.

EXEMPLOS

Os seguintes exemplos são ilustrativos dos méto-

dos e composições da invenção, e não se destinam a limitar o âmbito da invenção tal como reivindicada.

Exemplo 1 - Preparação de IgM e de fragmentos de IgM

Para resumir, IgM foi purificada a partir do eluato da coluna ANX do processo de preparação de IGIV (o segundo passo de permuta aniónica do processo tal como descrito na patente U.S. N° 6307028 de Lebing *et al.* (Lebing *et al.*), seguido por filtração em gel em SUPEROSE 6 que dá IgM mais de 90% pura. As principais impurezas são IgA (~6-8%) e IgG (<2%). Para remover as isoaglutininas, a IgM foi passada através de uma coluna contendo antigénio A e B sintético imobilizado. Os pormenores estão apresentados adiante.

A preparação de IgM humana altamente purificada, com baixo teor de isoaglutininas, baixo teor de oligómeros foi realizada por cromatografia de exclusão de tamanhos de eluato de permuta aniónica de IGIV (eluato ANX) seguido por remoção de isoaglutininas por cromatografia de afinidade. O perfil alvo para a preparação de IgM foi definido de modo a incluir limites de menos de 5% de IgA, menos de 5% de IgM oligomérica e menos de 0,3 UE/mL de endotoxina. O limite da Farmacopeia Europeia (FE) para actividade de isoaglutininas foi aplicado a IgM: menos de 1:64 a 50 mg/mL.

Todos os tampões foram autoclavados e filtrados através de um filtro de 0,22 µm para sacos estéreis,

isentos de pirogênios antes da utilização. O material de partida, eluato ANX, é uma solução a 0,2% de proteína, 0,5 M de acetato, pH 5,1, que pode conter tanto como 50% de IgM. O material proteico não IgM presente no eluato ANX é principalmente IgG e IgA. 1,3 L de eluato da coluna ANX congelado foi descongelado e o pH ajustado para 7,95 com NaOH 1,0 N. Após filtração através de um filtro estéril de 0,22 μm , o material foi concentrado num mini 100 K PELLICON e/ou numa cassete PELLICON XL (Millipore Corporation, Bedford, MA) a 15 a 25 mg/mL. 65 mL do concentrado (aproximadamente 1150 mg de proteína) foram carregados numa coluna SUPEROSE 6 FF de qualidade Prep com 5,0 cm x 70 cm (Pharmacia, Upsala, Suécia) equilibrada com TBS a um caudal linear de 15,3 cm/h.

Durante a eluição da fracção de IgM, foi ligada em série uma coluna Atri/Btri PAA SEPHAROSE 6 FF (Glycotech Corporation, Rockville, MD) de 5,0cm x 5,1 cm.

Como se observa na Fig. 13, a porção central do pico de IgM (aproximadamente 200 mL) foi recolhida em recipientes estéreis, amostrada e imediatamente dialisada contra glicina 0,2 M, pH 4,2, utilizando tubo de diálise estéril. A diálise consistiu em quatro mudanças x 2 L ao longo de um período de 18 horas a 4°C. Após a diálise, os sublotes foram esterilizados por filtração e diluídos para 2,0 mg/mL, e depois armazenados a +4°C até serem reunidos. Os rendimentos percentuais para cada sublote estavam entre 27 e 68% de recuperação de IgM. A maior parte das perdas de

IgM foram devidas a oligomerização de IgM, que eluiu no volume vazio da coluna de exclusão de tamanhos.

Onze sublotos de material foram reunidos para formar um único lote de IgM, que foi em seguida esterilizado por filtração através de um filtro de 0,22 µm e introduzido em quatro frascos de 280 mL estéreis e vinte frascos de 1 mL. A formulação do material em tampão de glicina 0,2 M, pH 4,2, deu um produto que se demonstrou ser estável contra a oligomerização a +4°C durante 12 meses. A caracterização bioquímica do material está descrita na Tabela 2.4.1.

Tabela 1 - Caracterização de IgM purificada.

Ensaio	Método	Especificação	Resultados do ensaio
Proteína total	A280/ml	1,5-2,5 mg/mL	1,6 mg/mL
% de Oligómero	SEC-HPLV	NMT 5%	<0.1%
% de IgA	Imunonefelometria	NMT 5%	1,6%
IgG	Imunonefelometria		0,03 mg/mL
IgM	Imunonefelometria		2,51 mg/mL
CH50	100 CH50	<75 unidades	43
Isoaglutinina	Ensaio da prova inversa de isoaglutinação	Negativa a 1:64 a 50 mg/mL	Negativa a 1:4
Endotoxina	LAL	<0,3 UE/mL	<0,06 UE/mL
pH	Não diluído	4,0-4,4	4,24
Pureza	SDS-PAGE redutora		91%
% de proteínas	Biureto	1-2 mg/mL	2,20 mg/mL

A proteína total foi calculada utilizando o

coeficiente de extinção específico publicado ($\epsilon^{1\%}$ 280) de 13,3. A análise de aminoácidos (Commonwealth Biotechnologies, Richmond, VA) desta preparação de IgM resultou num coeficiente de extinção específico de 13,4. A percentagem de oligómeros foi determinada utilizando uma coluna 10/30 SUPEROSE 6 PHARMACIA HR e é definida como a percentagem da área aos 15,7 minutos dividida pela área total do cromatograma. As amostras submetidas ensaio da prova inversa de isoaglutinação foram concentradas para 50 mg/mL após ajustamento do pH para 7,5 com 10xPBS. Purificar por SDS-PAGE redutora definida por um procedimento em dois passos. Primeiro, determinar o conteúdo da única banda X não identificada no gel; dá a percentagem total de imunoglobulinas na preparação. No segundo passo, o teor de IgA e IgG é determinado medindo a intensidade das bandas de cadeias pesadas de todas as três imunoglobulinas. Assim, a pureza da IgM é igual a 100% - % da banda X - % de IgA - % de IgG.

Verificou-se que a IgM tende a formar oligómeros estáveis num processo dependente da concentração e do tempo. A estratégia de purificação, portanto, incluiu passos para minimizar a oligomerização de IgM como o processamento a pH baixo, manutenção das preparações de IgM a baixa concentração e minimização da exposição de IgM a elevado teor de sal. As preparações finais de IgM foram formuladas numa solução de glicina 0,2 M (pH 4,2) para evitar a formação de oligómero; nesta formulação a IgM é estável e adequada para injecções.

Para experiências envolvendo fragmentos de IgM, esses fragmentos foram preparados utilizando um kit de fragmentação de IgM disponível comercialmente (Pierce, N° de catálogo 44887). Este kit tem a capacidade de fragmentar IgM por três métodos (ver Fig. 6). A alquilação e redução de IgM com 2-mercaptoetilamina e iodoacetamida foi utilizada para gerar derivados de IgM de interesse. Os derivados de IgMs foram analisados em Tris-Acetato PAGE a 3-8% (ver Fig. 7). Observou-se quatro fragmentos ISM principais correspondentes aos pesos moleculares esperados para IgM monomérica (~200 kDa) e metade da IgM monomérica (100 kDa). Os fragmentos gerados durante um tratamento de IgM com 2-mercaptoetilamina (MEA) foram comparados com IgM não tratada numa corrida em gel de Tris-acetato a 3-8% durante 90 minutos a 150 volts. O gel foi corado com Coomassie e digitalizados usando o software QUANTITY ONE. A Figura 6 ilustra os resultados do processo de fragmentação de IgM com MEA, juntamente com resultados utilizando outros métodos. A Figura 7 mostra os resultados de electroforese em gel de IgM e IgM tratada com MEA (mostrando espécies de fragmentos que correspondem a fragmentos de tipo "IgG" e "r IgG" ilustrados na Figura 6).

Exemplos 2-10 - Ensaios de ligação

Nos Exemplos 2-10 adiante, após as experiências indicadas, as placas foram lavadas 6 vezes com tampão de lavagem (soro fisiológico tamponado com Tris com 0,1% de

monolaurato de polioxietileno sorbitano e 0,01% de azida de sódio). 100 µL de um conjugado de anti-IgM humana de cabra-peroxidase de rábano (com especificidade para a região Fc5µ) foram adicionados a cada poço e a placa foi incubada durante 1 hora a 25°C com agitação suave. A placa foi então lavada 3 vezes com tampão de lavagem e desenvolvida com 100 µL de substrato de peroxidase de micropoços TMB (KPL cat# 50-76-00) durante 5 minutos à temperatura ambiente. A reacção foi então parada com 100 µL de ácido fosfórico 1 M e a placa foi lida a 450 nm num leitor de placas SPECTRAMAX 190 com interface de computador utilizando o software SOFTMAX PRO 4.0.

Exemplo 2 - Ligação de IgM a Aβ 1-42 de comprimento total, Aβ 22-35 e inibidor de proteína α1

Uma placa de microtitulação com 96 poços Nunc MAXISORP foi passivamente revestida com 100 µL de 2 µg/mL de Aβ 1-42, Aβ 22-35 e uma proteína não relacionada (inibidor de protease α1, α1PI) durante 1 hora a 25°C com agitação suave. As duas últimas filas da placa foram revestidas com 100 µL de PIERCE SUPERBLOCK para servir como um controlo negativo (não específico). Após o processo de revestimento, a placa foi lavada duas vezes com 300 µL de tampão de lavagem. A placa foi bloqueada com 100 µL de SUPERBLOCK durante 1 hora a 25°C com agitação suave e lavada duas vezes com tampão de lavagem. 100 µL de IgM diluídos em série em SUPERBLOCK foram adicionados à placa e incubados durante 2 horas a 25°C com agitação suave. Os resultados estão apresentados na Figura 2.

Exemplo 3 - Imunodepleção de IgM por A β 1-42

Uma placa de microtitulação com 96 poços NUNC MAXISORP foi revestida passivamente com 100 μ L de 2 μ g/mL de A β 1-42 e α 1PI durante 1 hora a 25°C com agitação suave. Após o processo de revestimento, a placa foi lavada duas vezes com tampão de lavagem. A placa foi bloqueada com 100 μ L de SUPERBLOCK durante 1 hora a 25°C com agitação suave e lavada duas vezes com tampão de lavagem. Anteriormente, 0,2 miligramas de IgM foram incubados com uma coluna de purificação de afinidade desacoplada e acoplada a A β 1-42 coluna de um dia para o outro a 4°C com balanço suave. O material IgM empobrecido (fluxo de passagem) foi diluído em série SUPERBLOCK e incubado durante 2 horas a 25°C com agitação suave. Os resultados estão apresentados na Figura 3.

Exemplo 4 - Inibição da ligação de IgM a A β por péptidos relacionados e não relacionados com A β

Duas placas de microtitulação com 96 poços NUNC MAXISORP foram revestidas passivamente com 100 μ L de 2 μ g/ml de A β 1-42 durante 1 hora, a 25°C com agitação suave. Após o processo de revestimento, as placas foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem. As placas foram bloqueadas com 100 μ L de SUPERBLOCK durante 1 hora a 25°C com agitação suave e lavadas duas vezes com tampão de lavagem. 100 μ L de péptidos A β (A β 1-28, A β 22-35, A β 25-35, A β 1-40 e A β 1-42) e α 1PI foram diluídos em série em SUPERBLOCK com

0,1 mg/mL de IgM, adicionados às placas e incubados durante 2 horas a 25°C com agitação suave. Além disso, adicionou-se 100 µL de IgM diluídos em série em SUPERBLOCK às duas filas superiores de cada placa. Os resultados estão apresentados nas Figuras 4A e 4B.

Exemplo 5 - Inibição da ligação de IgM a Aβ 1-42 por GAMUNEX competitivo

Uma placa de microtitulação com 96 poços NUNC MAXISORP foi passivamente revestida com 100 µL de 2 µg/mL de Aβ 1-42 durante 1 hora a 25°C com agitação suave. Após o procedimento de revestimento, a placa foi lavada duas vezes com tampão de lavagem. A placa foi bloqueada com 100 µL de SUPERBLOCK durante 1 hora a 25°C com agitação suave e lavada duas vezes com tampão de lavagem. Adicionou-se 100 µL de GAMUNEX diluídos em série em SUPERBLOCK com 0,1 mg/mL de IgM à placa e incubou-se durante 2 horas a 25°C com agitação suave. Também se adicionou à placa 100 µL de IgM e GAMUNEX, diluídos em série em SUPERBLOCK, e serviram como controlos positivo e negativo. Os resultados estão apresentados na Figura 5.

Exemplo 6 - Ligação de Ab1-42 por IgM fragmentada por MEA

Uma placa de microtitulação com 96 poços NUNC MAXISORP foi passivamente revestida com 100 µL de 2 µg/mL de Aβ 1-42 e α1PI durante 1 hora a 25°C com agitação suave.

Após o procedimento de revestimento, a placa foi lavada duas vezes com tampão de lavagem. A placa foi bloqueada com 100 μ L de SUPERBLOK durante 1 hora, a 25°C com agitação suave e lavada duas vezes com tampão de lavagem. 100 μ L de IgM e de IgM tratada com 2-mercaptoetilamina, diluídos em série em SUPERBLOCK, foram adicionado à placa e incubados durante 2 horas a 25°C com agitação suave. Os resultados estão apresentados na Figura 8.

Exemplo 7 - Ligação de IgM a placas revestidas com A β 1-40, A β 1-42, A β 1-43 e α 1PI

Uma placa de microtitulação com 96 poços NUNC MAXISORP foi passivamente revestida com 100 μ L de 2 μ g/mL de A β 1-40, A β 1-42, A β 1-43 e α 1PI (controlo negativo) durante 1 hora a 25°C com agitação suave. Após o processo de revestimento, a placa foi lavada duas vezes com tampão de lavagem. A placa foi bloqueada com 100 μ L de SUPERBLOCK durante 1 hora a 25°C com agitação suave e lavada duas vezes com tampão de lavagem. 100 μ L de IgM diluídos em série em SUPERBLOCK foram adicionados à placa e incubados durante 2 horas a 25°C com agitação suave.

Na *pool* de IgM, demonstrou-se título muito semelhante de actividade de ligação específica para A β 1-42 e A β 1-43. Este título é cerca de 10 vezes maior do que o título de A β 1-40. Os dados demonstram que a maioria do título anti-A β na *pool* de IgM está dirigida para a extremidade C-terminal extrema de A β . Parece portanto que

os aminoácidos 41 e 42 são necessários para a ligação a IgM. Ver Figura 9.

Exemplo 8 - Ligação de IgM a placas revestidas com A β 1-40, A β 1-42, A β 1-43 e α 1PI

Uma placa de microtitulação com 96 poços NUNC MAXISORP foi passivamente revestida com 100 μ L de 2 μ g/mL de A β 1-42 durante 1 hora a 25°C com agitação suave. Após o processo de revestimento, a placa foi lavada duas vezes com tampão de lavagem. A placa foi bloqueada com 100 μ L de SUPERBLOCK durante 1 hora a 25°C com agitação suave e lavada duas vezes com tampão de lavagem. A cada uma de soluções a 0,1 mg/mL de A β 1-40, A β 1-42 e A β 1-43 adicionou-se 7 mg/mL de IgM para se obter uma concentração final de IgM de 0,07 mg/mL. Em seguida, as soluções foram diluídas em série em 0,07 mg/mL de IgM e adicionou-se 100 μ L à placa e incubou-se durante 2 horas a 25°C com agitação suave. A placa foi então lavada seis vezes com tampão de lavagem, adicionou-se a cada poço 100 μ L de conjugado de peroxidase de rábano com anti-IgM humana de cabra e a placa foi incubada durante 1 hora a 25°C com agitação suave.

Os dados demonstram que A β 1-42 e A β 1-43 inibem completamente a ligação de IgM a placas revestidas com A β 1-42. A β 1-40, mesmo em concentrações 10 vezes maiores do que A β 1-42 e A β 1-43, só inibe cerca de 50% da ligação de IgM a placas revestidas com A β 1-42. Esta experiência novamente aponta para a importância da extremidade C-

terminal extrema de amilóide β (aminoácidos 41 e 42) para a ligação a IgM. Ver a Figura 10.

Exemplo 9 - Ligação a A β 1-42 - Competição de A β 1-40, A β 1-42, A β 33-42 e A β 37-42

Uma placa de microtitulação com 96 poços NUNC MAXISORP foi passivamente revestida com 100 μ L de 2 μ g/mL de A β 1-42 durante 1 hora a 25°C com agitação suave. Após o processo de revestimento, a placa foi lavada duas vezes com tampão de lavagem. A placa foi bloqueada com 100 μ L de SUPERBLOCK durante 1 hora a 25°C com agitação suave e lavada duas vezes com tampão de lavagem. A uma solução a 0,5 mg/mL de A β 37-42 e a cada uma das soluções a 0,1 mg/mL de A β 1-40, A β 1-42 e A β 33-42 adicionou-se 7 mg/mL de IgM para se obter uma concentração final de IgM de 0,07 mg/mL. Em seguida as soluções foram diluídas em série em 0,07 mg/mL de IgM e adicionou-se 100 μ L à placa e incubou-se durante 2 horas a 25°C com agitação suave.

A β 1-42 é capaz de inibir completamente a ligação de IgM a placas revestidas com A β 1-42. Os péptidos β -amilóides fragmentados não apresentam mais inibição do que A β 1-40. Este dado demonstra que, para além dos aminoácidos 41 e 42, parece haver necessidade de um péptido maior do que 10 aminoácidos, possivelmente com uma estrutura terciária, para inibir a ligação de IgM a placas revestidas com A β 1-42. Ver Figura 11.

Exemplo 10 - Ligação a A β 1-42 - Competição de Ligação a A β 1-42 - Competição de A β 1-42 e A β 1-42 desordenado

Uma placa de microtitulação com 96 poços NUNC MAXISORP foi passivamente revestida com 100 μ L de 2 μ g/mL de A β 1-42 durante 1 hora a 25°C com agitação suave. Após o processo de revestimento, a placa foi lavada duas vezes com tampão de lavagem. A placa foi bloqueada com 100 μ L de SUPERBLOCK durante 1 hora a 25°C com agitação suave e lavada duas vezes com tampão de lavagem. A cada uma de soluções de 0,1 mg/mL de soluções de A β 1-42 e A β 1-42 desordenado adicionou-se 7 mg/mL de IgM para se obter uma concentração final de IgM de 0,07 mg/mL. Em seguida as soluções foram diluídas em série em 0,07 mg/mL de IgM e adicionou-se 100 μ L à placa e incubou-se durante 2 horas a 25°C com agitação suave.

Os dados demonstram a especificidade do título de IgM é para A β 1-42 e não para o péptido do mesmo tamanho contendo a totalidade dos 42 aminoácidos. Ver Figura 12.

Exemplo 11 - Ligação de IgM, IgM monomérica e IgG a A β 1-42

O sistema OCTET (ForteBio, Inc., Menlo Park, CA) utiliza a tecnologia BLI (Bio-Layer Interferometry) para medir a concentração, afinidade e cinética entre duas proteínas/péptidos. A BLI detecta alterações no padrão de

interferência (luz reflectida) consoante o número de moléculas aumenta ou diminui em relação à ponta do detector.

Biossensores revestidos com estreptavidina foram primeiro colocados em poços contendo PBS para equilibrar os detectores. Em seguida, os biossensores foram colocados em poços contendo 2 µg/mL de Aβ 1-42 biotinilado e depois transferidas para poços contendo PBS de forma a que pudesse ser criado um perfil de interferência do fundo. Estes biossensores foram então transferidos para poços que continham ou *pool* de IgM, *pool* de IgM monomérica ou *pool* de IgG (GAMUNEX) e as velocidades de associação foram determinadas. Finalmente, os biossensores foram transferidos para poços contendo PBS para medir as velocidades de dissociação.

Os dados gerados com base nesta experiência demonstraram que a *pool* de IgM e a *pool* de IgM monomérica têm pelo menos uma afinidade 5 vezes maior para Aβ 1-42 biotinilado do que a *pool* de IgG (GAMUNEX).

Exemplo 12 - Modelo de AD do murgancho transgénico

O B6;SJL-Tg(APPSWE)2576Kha ou murgancho "Tg2576" exprime uma forma mutada do gene APP695 humano determinada por um promotor do gene da proteína de prião de cobaio (ver patente U.S. N° 5877399). Estes murganchos têm memória de referência espacial normal aos três meses de idade, mas apresentam comprometimento pelos 9 a 10 meses de idade

(Hsiao *et al.*, "Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice", *Science* 274:99-102 (1996)). O teor de APP no cérebro transgênico é 5,6 vezes mais do que o APP endógeno. Este aumento acompanha o aparecimento de determinados défices comportamentais. Numerosas placas de A β positivas a Vermelho do Congo estão presentes com níveis elevados de A β solúvel. As placas amilóides parecem estimular uma resposta inflamatória celular. Ambos astrócitos hipertróficos e células microgliais activadas rodeiam as placas (Irizarry, M., "APPsw transgenic mice develop age-related A β deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1", *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56:965-73 (1997); Frautschy, S. A. *et al.*, "The microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice", *Am. J. Pathol.* 152: 307-17 (1998)), e a angiopatia amilóide surge em alguns vasos (Klunk, W. *et al.*, "Staining of AD and Tg2576 mouse brain with X-34, a highly fluorescent derivative of chrysamine G and a potential *in vivo* probe for β -sheet fibrils", *Soc. Neurosci. Abstr.* 23:1638 (1997)). Além disso, os marcadores chave de stress oxidativo são induzidos em cérebro de murganho Tg2576 (Pappolla, M. A. *et al.*, "Evidence of oxidative stress and *in vivo* neurotoxicity of β -amyloid in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease", *Am. J. Pathol.* 752:871-7 (1998)), semelhante ao que se observa no cérebro de doentes de AD na autópsia.

Tipicamente, são recebidas 14 Tg2576 grávidas (10-15 dias de gestação) e 4 fêmeas do tipo selvagem grávi-

das (Taconic Farms, Inc., Germantown, NY). Os murganhos (crias) são distribuídos aleatoriamente pelos grupos de tratamento como se segue (Tabela 2).

Tabela 2. Números aproximados de murganhos por tratamento.

Estirpe	#/tratamento	Soro fisiológico	hIgM
Tg2576	26	8	32
Tipo selvagem	8	8	8

Dentro de 24 horas do nascimento, as crias tratadas recebem injeções intraperitoneais ou soro fisiológico normal estéril (50 µL) ou IgM humana (hIgM) (50 µL de 20 µg/µL). Em seguida, os murganhos são injectados com soro fisiológico ou hIgM de acordo com o seguinte esquema (Tabela 3 - Ver Khole, V. et al., "Identification of epididymis specific antigen by neonatal tolerization", *Am. J. Repro. Immunol.* 44:350-356 (2000)).

Tabela 3. Esquema de imunização por tolerização neonatal

	Dia 1	Dia 5	Dia 21	Dia 35	Dia 49
Via ^c	i.p.	i.p.	s.q.	s.q.	s.q.
Concentração	20 µg/µL	20 µg/µL	100 µg/µL	100 µg/µL	100 µg/µL
Volume	50 µL	50 µL	100 µL ^a	100 µL ^a	100 µL ^a
Adjuvante ^b	Não	Não	Sim	Sim	Sim

^a Sítios múltiplos

^b TITERMAX Gold (CyTRx Corporation, Parkway Technology Park, Georgia).

^c As injeções vão ser dadas com uma agulha de 27G, 1/2"

A semi-vida de IgM polirreativa humana (hIgM) em murganhos é de 8,0 horas (Sigounas, G. et al., "Half-life of polyreactive antibodies", *J. Clin. Immunol.*, 74:134-140 (1994)). Assim, estes anticorpos são eliminados da circulação após 56 horas (7 semi-vidas). A partir dos 6 meses de idade, os murganhos recebem 100 µL (400 mg/kg) de hIgM sem adjuvante, subcutaneamente, na terça-feira e sexta-feira de cada semana (Dodel, R. C. et al., "Intravenous immunoglobulins containing antibodies against β -amyloid for the treatment of Alzheimer's disease", *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 75: 1472-4 (2004)). O tratamento com anticorpo continua até a conclusão do estudo.

Os murganhos são amostrados no dia 56 quanto a anticorpos para hIgM. Não mais do que 50 µL de sangue total são obtidos cortando a veia safena lateral superficialmente com uma lâmina de bisturi nº 15 estéril. É aplicada pressão manual para conseguir hemostase antes de os murganhos serem devolvidos às gaiolas. A amostra é centrifugada à temperatura ambiente para separar as células sanguíneas do plasma. O plasma é recolhido e imediatamente congelado a -80°C até à análise.

Os murganhos são sacrificados humanamente utilizando CO₂ gasoso aos 12-15 meses de idade ou se aparentam estar moribundos antes dessa altura. Obtém-se sangue através da veia cava caudal após eutanásia. Os cérebros são colhidos e metade são rapidamente congelados para análise

de péptido A β solúvel e metade são colocados em 10% de formol tamponado neutra para coloração imuno-histoquímica e análise histopatológica. As placas coradas vão ser contadas e o péptido A β solúvel vai ser quantificado no cérebro e no plasma. Os dados vão ser analisados quanto à normalidade e variância igual. Vai ser utilizado um teste t para avaliar diferenças entre murganhos tratados e não tratados. Os grupos serão considerados diferentes se o valor P <0,05.

Do que foi exposto será evidente que a descrição proporciona várias de utilizações. Por exemplo, a descrição proporciona a utilização de qualquer das preparações de imunoglobulinas de ligação a A β aqui descritas no tratamento ou profilaxia da doença amiloidogénica, ou no fabrico de um medicamento para utilização na mesma.

Lisboa, 26 de abril de 2013

REIVINDICAÇÕES

1. Preparação de imunoglobulinas produzida a partir de amostras de plasma humano reunidas como material de partida, em que a preparação de imunoglobulinas está enriquecida em imunoglobulina M (IgM) para utilização num método de tratamento ou prevenção de uma doença neurodegenerativa associada a amilóides, em que a preparação de imunoglobulinas compreende anticorpos IgM que se ligam especificamente a A β 1-42.

2. Utilização de amostras de plasma humano reunidas como materiais de partida no fabrico de um preparação de imunoglobulinas enriquecida em imunoglobulina M (IgM) para tratamento ou prevenção de uma doença neurodegenerativa associada a amilóides, em que a preparação de imunoglobulina compreende anticorpos IgM que se ligam especificamente a A β 1-42.

3. Preparação para utilização de acordo com a reivindicação ou utilização de acordo com a reivindicação 2, em que a preparação de imunoglobulinas compreende pelo menos cerca de 80% de IgM ou pelo menos cerca de 90% de IgM.

4. Preparação para utilização de acordo com as reivindicações 1 ou 3 ou utilização de acordo com qualquer das reivindicações 2 ou 3, em que a doença é doença de Alzheimer.

5. Preparação para utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1, 3 ou 4 ou utilização de acordo com qualquer das reivindicações 2, 3 ou 4, em que a preparação de imunoglobulina é administrado numa dosagem de imunoglobulina de cerca de 0,1 µg por kg de peso corporal a cerca de 1000 mg por kg de peso corporal.

6. Preparação para utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1, 3, 4 ou 5 ou utilização de acordo com qualquer das reivindicações 2, 3, 4 ou 5, em que a preparação de imunoglobulina é administrada numa dosagem de cerca de 0,5 µg por kg de peso corporal a cerca de 500 mg por kg de peso corporal; de cerca de 0,5 µg por kg de peso corporal a cerca de 100 mg por kg de peso corporal; ou de cerca de 5 µg por kg de peso corporal a cerca de 50 mg por kg de peso corporal.

7. Composição farmacêutica compreendendo moléculas de imunoglobulina M (IgM) que se ligam especificamente a Aβ 1-42 para utilização num método de tratamento ou prevenção de uma doença neurodegenerativa associada a amilóides, em que a IgM é obténível a partir de material de partida compreendendo imunoglobulinas e outras substâncias por:

a) ajustamento do pH do material de partida para formar uma solução intermédia que compreende imunoglobulinas dissolvidas,

b) ajustamento da solução intermédia do passo a) a condições de pH, temperatura e concentração de caprilato tais que se formam um primeiro precipitado e um primeiro sobrenadante compreendendo imunoglobulinas,

c) separação do primeiro sobrenadante do primeiro precipitado,

d) incubação do primeiro sobrenadante em condições de tempo, pH, temperatura e concentração de caprilato tais que se formam um segundo precipitado e um segundo sobrenadante compreendendo imunoglobulinas,

e) separação do segundo sobrenadante do segundo precipitado,

f) contacto do segundo sobrenadante com uma primeira resina de permuta aniónica em condições de pH e força iónica tais que substancialmente nenhuma da imunoglobulina G ou imunoglobulina M está ligada à primeira resina, mas a imunoglobulina A e outras substâncias estão ligadas à primeira resina,

g) separação de uma fracção contendo substancialmente toda a imunoglobulina G e imunoglobulina M do resultado do passo anterior,

h) contacto da imunoglobulina G e M com uma segunda resina de permuta aniónica em condições de pH e força iónica tais que substancialmente nenhuma da imunoglobulina G está

ligada à segunda resina mas a imunoglobulina M e outras substâncias estão ligadas à segunda resina,

i) eluição da IgM da segunda coluna de resina de permuta aniónica com uma solução tamponada tendo uma condutividade na gama da que é encontrada numa solução de cloreto de sódio pelo menos 100 mM,

j) aplicação da IgM numa resina de filtração de gel e recuperar a IgM,

k) aplicação da IgM numa resina de afinidade compreendendo antigénios A e B imobilizados, e

l) recuperação da IgM.

8. Composição farmacêutica para utilização de acordo com a reivindicação 7, em que o material de partida é derivado de produtos do sangue humano reunidos.

9. Composição farmacêutica para utilização de acordo com a reivindicação 7 ou 8, em que os produtos do sangue humano reunidos são recolhidos de dadores que não foram sujeitos a rastreio para determinar o seu título anti-imunoglobulina A β .

Lisboa, 26 de abril de 2013

FIG. 1

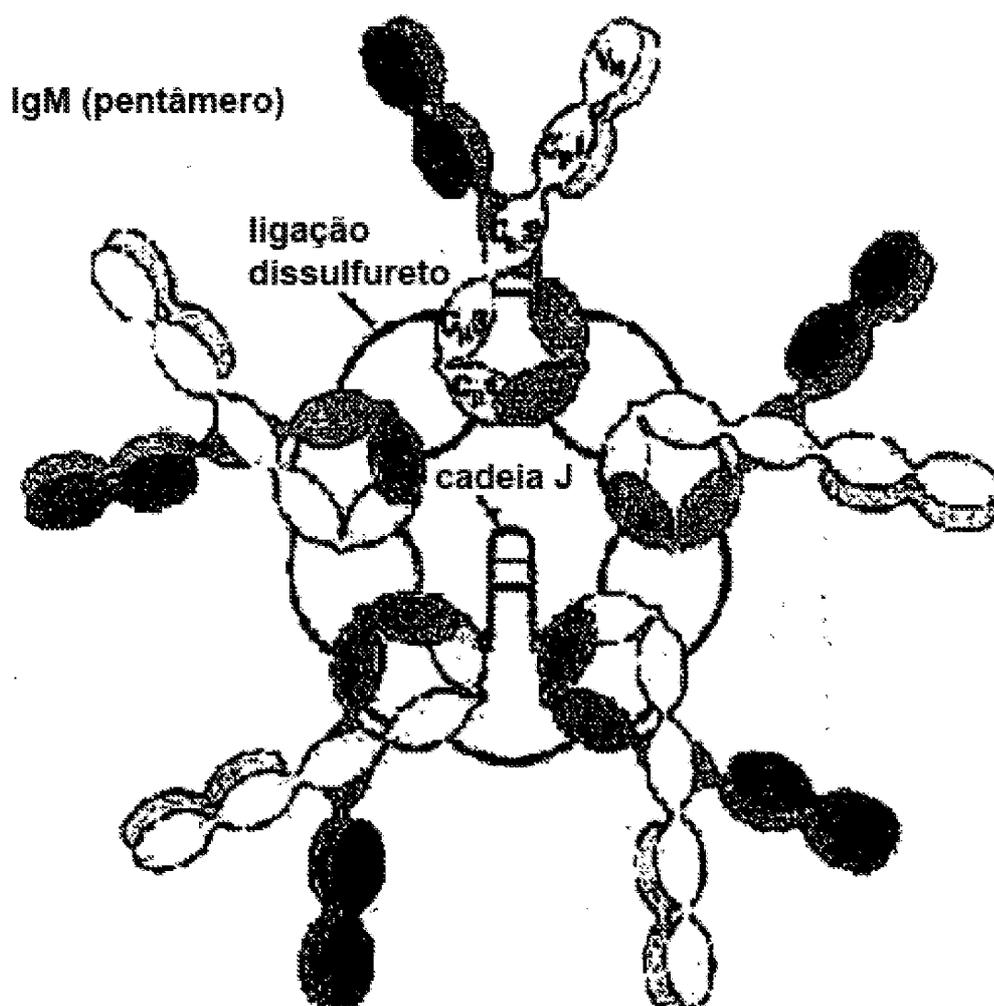


FIG. 2

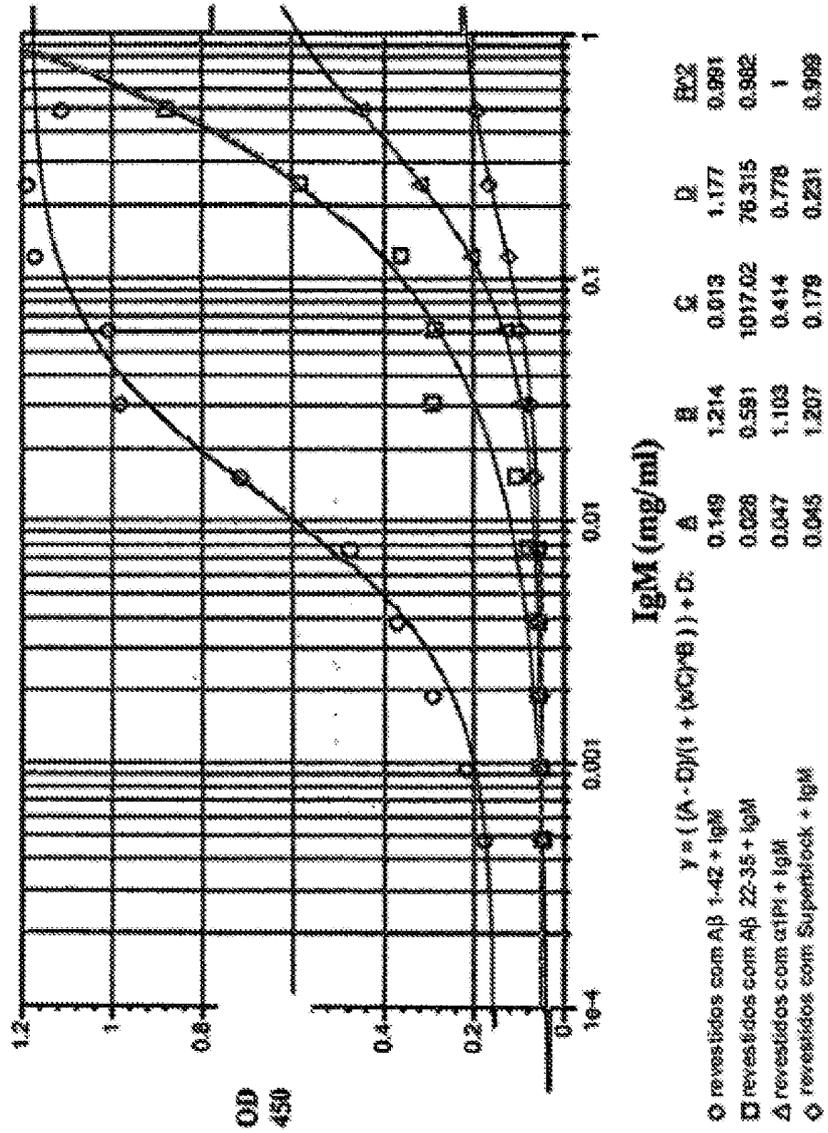


FIG. 3

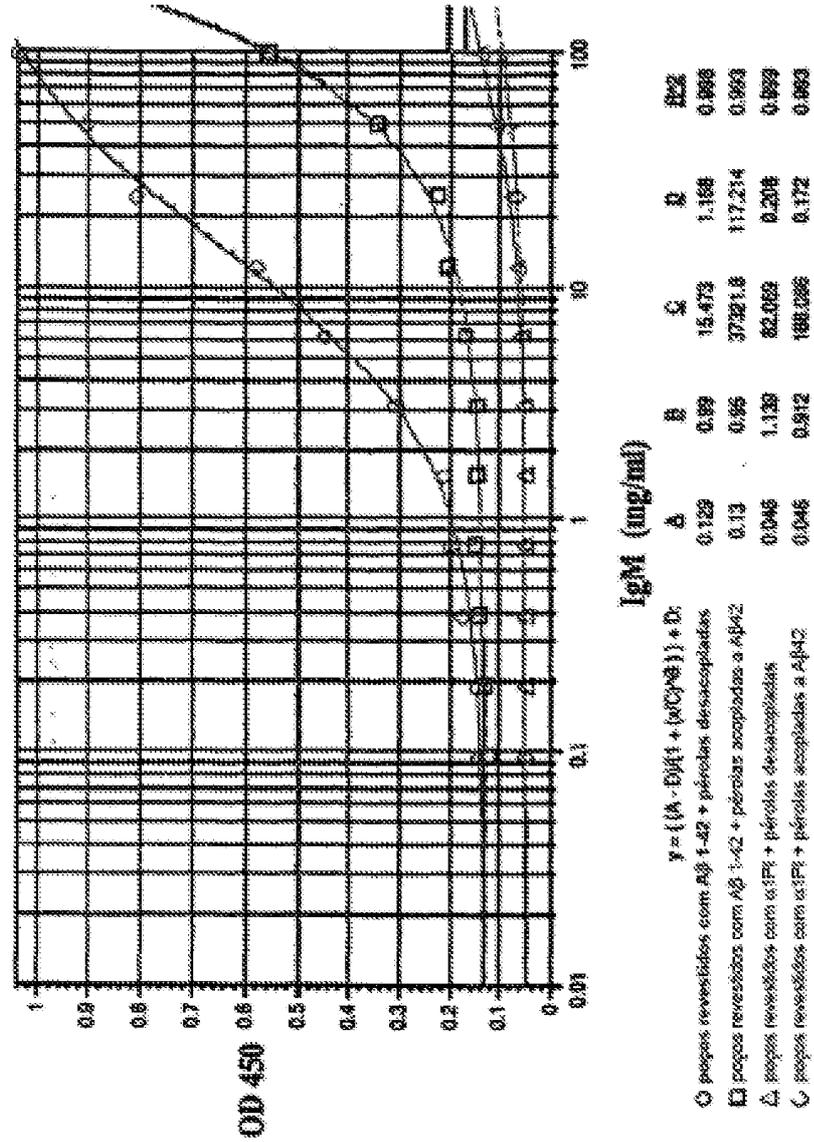
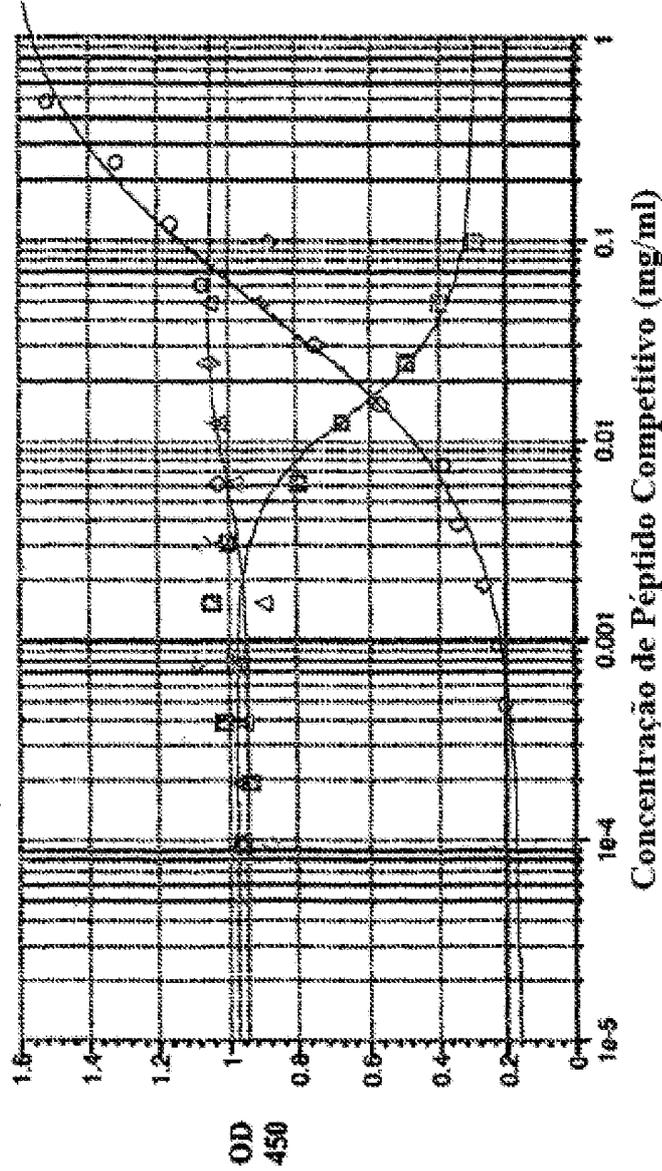


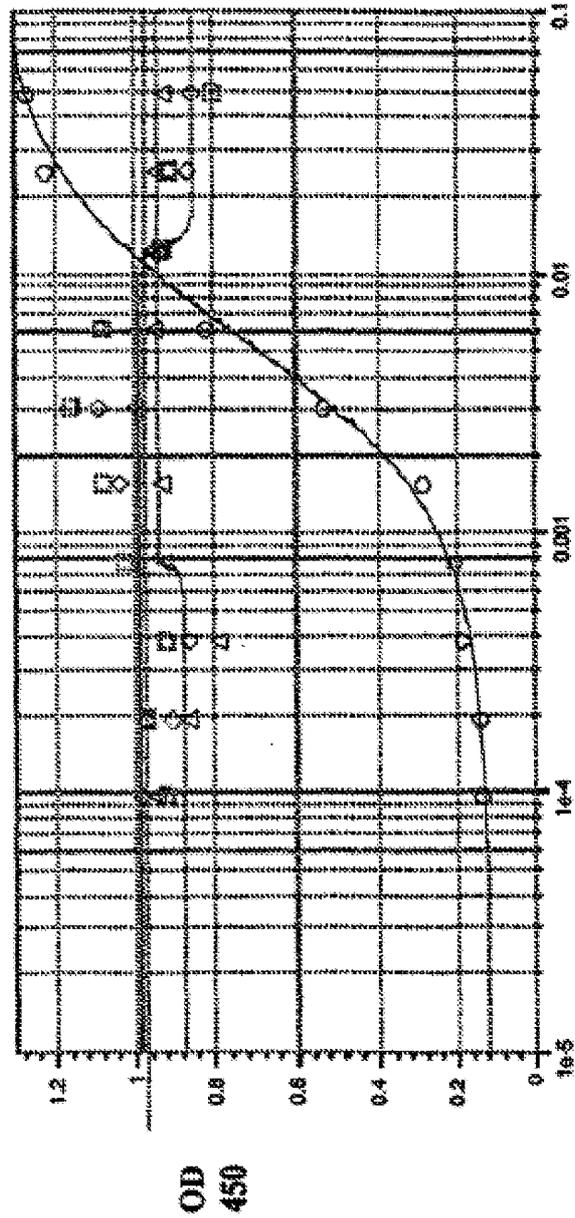
FIG. 4A



$y = (A - D)/(1 + (x/C)^B) + D$

	Δ	\square	\square	\square	EC2
○ igM sem quaisquer péptidos competitivos	0.158	0.651	0.05	1.663	0.934
□ igM em competição com Aβ 1-42	0.976	1.738	0.015	0.295	0.964
△ igM em competição com Aβ 22-35	0.942	1.84	0.007	1.055	0.728
○ igM em competição com α1PI					
	Erro de ajustamento				

FIG. 4B

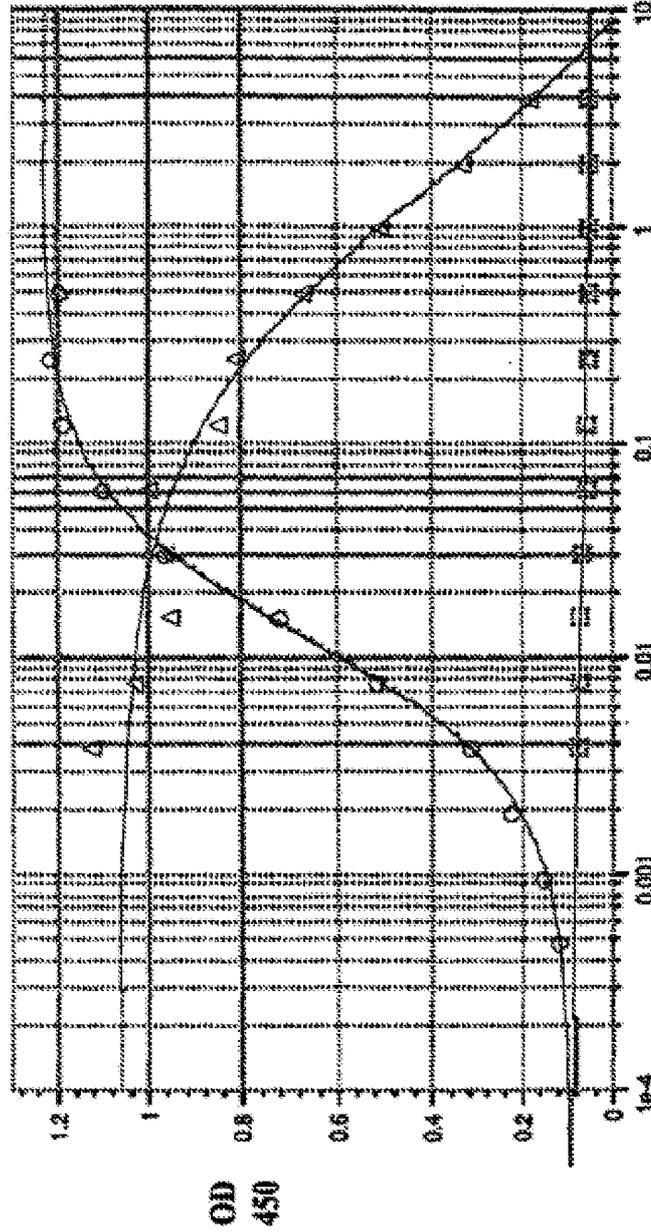


Concentração de Peptido Competitivo (mg/mL)

$$y = \frac{(A - D)(1 + (C/P)^B)}{1 + (C/P)^B} + D$$

	A	B	C	D	R2
○ IgM sem peptidos competitivos	0.117	1.246	0.006	1.346	0.963
□ IgM em competição com Aβ 1-40	-26.478	0.265	2.34e-27	0.978	0.009
△ IgM em competição com Aβ 1-28	0.873	27.177	7.58e-4	0.943	0.404
◇ IgM em competição com Aβ25-35	0.992	17.698	0.013	0.951	0.413

FIG. 5



	A	B	C	D	R ²
○ IgM	0.091	1.209	0.013	1.229	0.999
□ Control: Gamunex revestido na placa	0.083	0.767	0.019	0.046	0.994
△ IgM em competição com Gamunex	1.061	0.707	1.822	-0.343	0.984

$$y = ((A - D)/(1 + (x/B)^C)) + D$$

FIG. 7

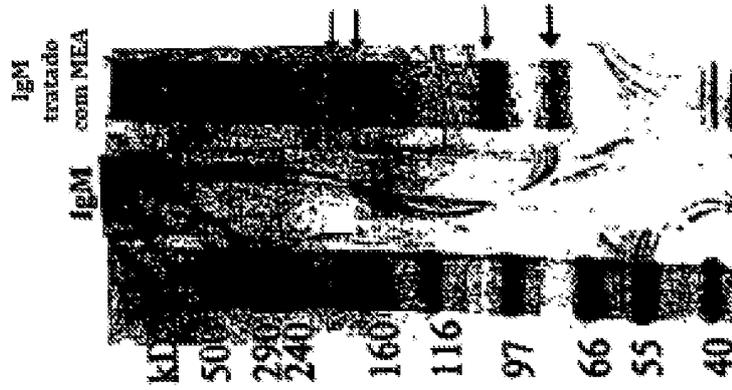


FIG. 6

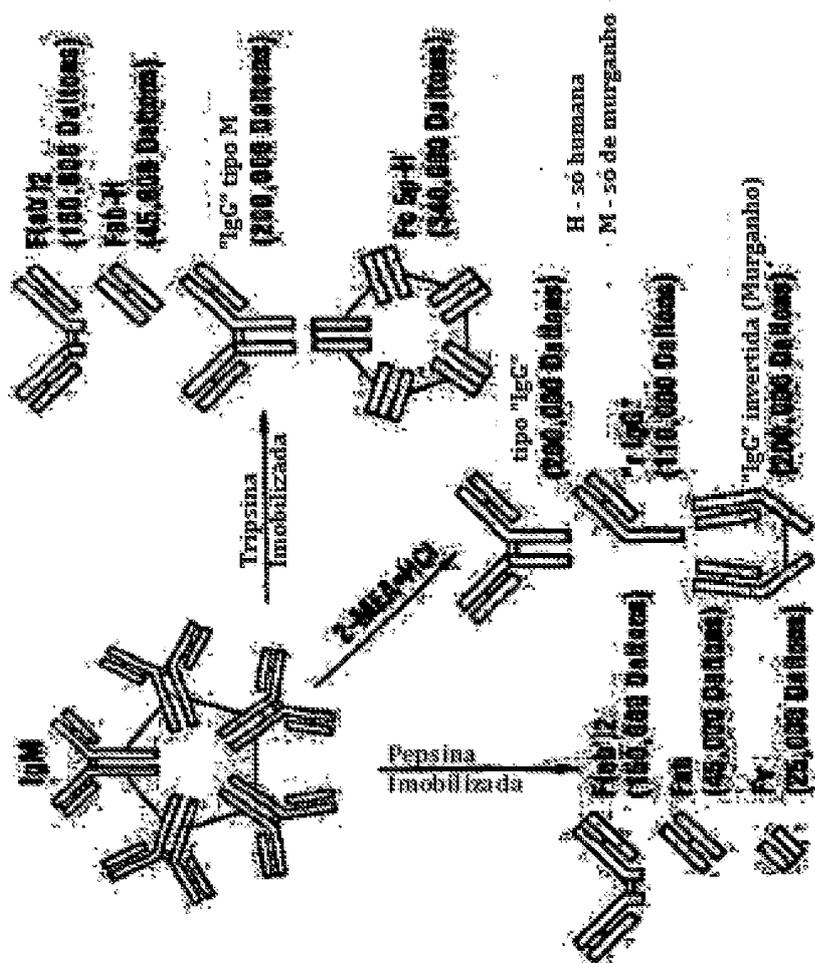
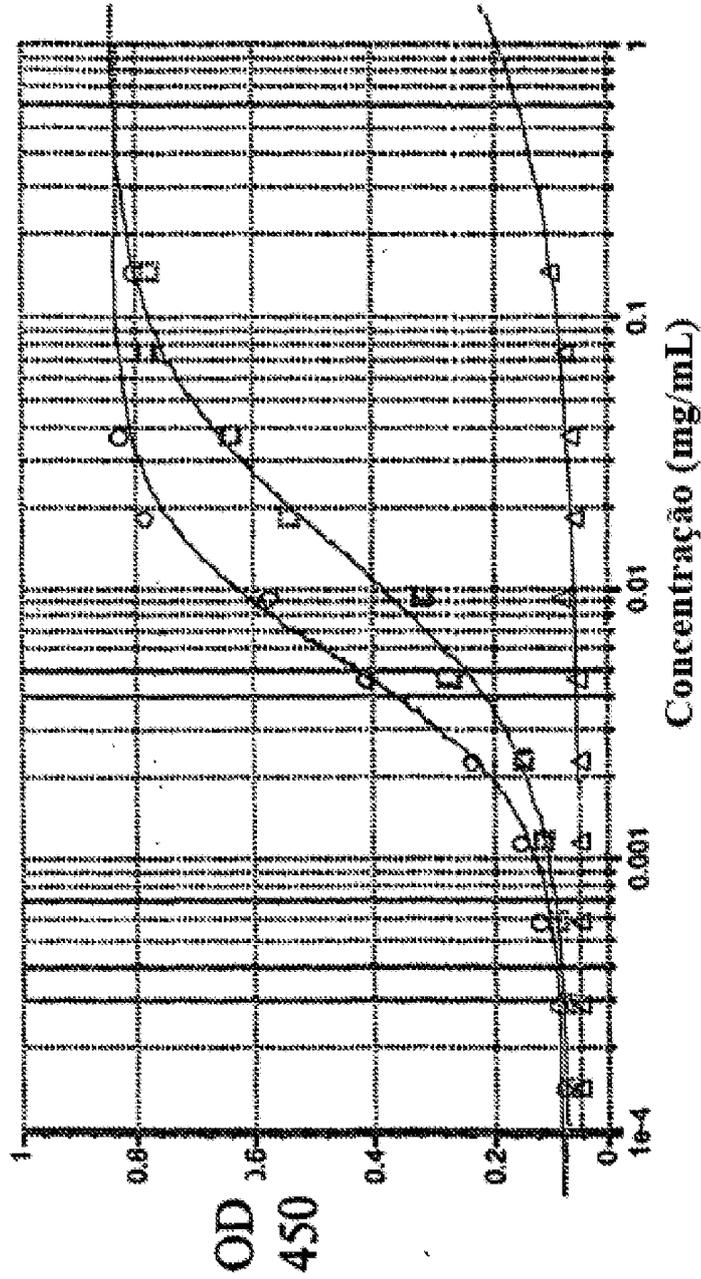


FIG. 8



$y = ((A - D)/(1 + (x/C)^B)) + D$

	A	B	C	D	R ²
○ poços revestidos com Aβ 1-42 + IgM não tratada	0.076	1.595	0.006	0.841	0.995
◻ poços revestidos com Aβ 1-42 + MEA-IgM	0.066	1.16	0.014	0.849	0.993
△ poços revestidos com α1PI + MEA-IgM	0.045	0.594	49.29	1.529	0.811

FIG. 9

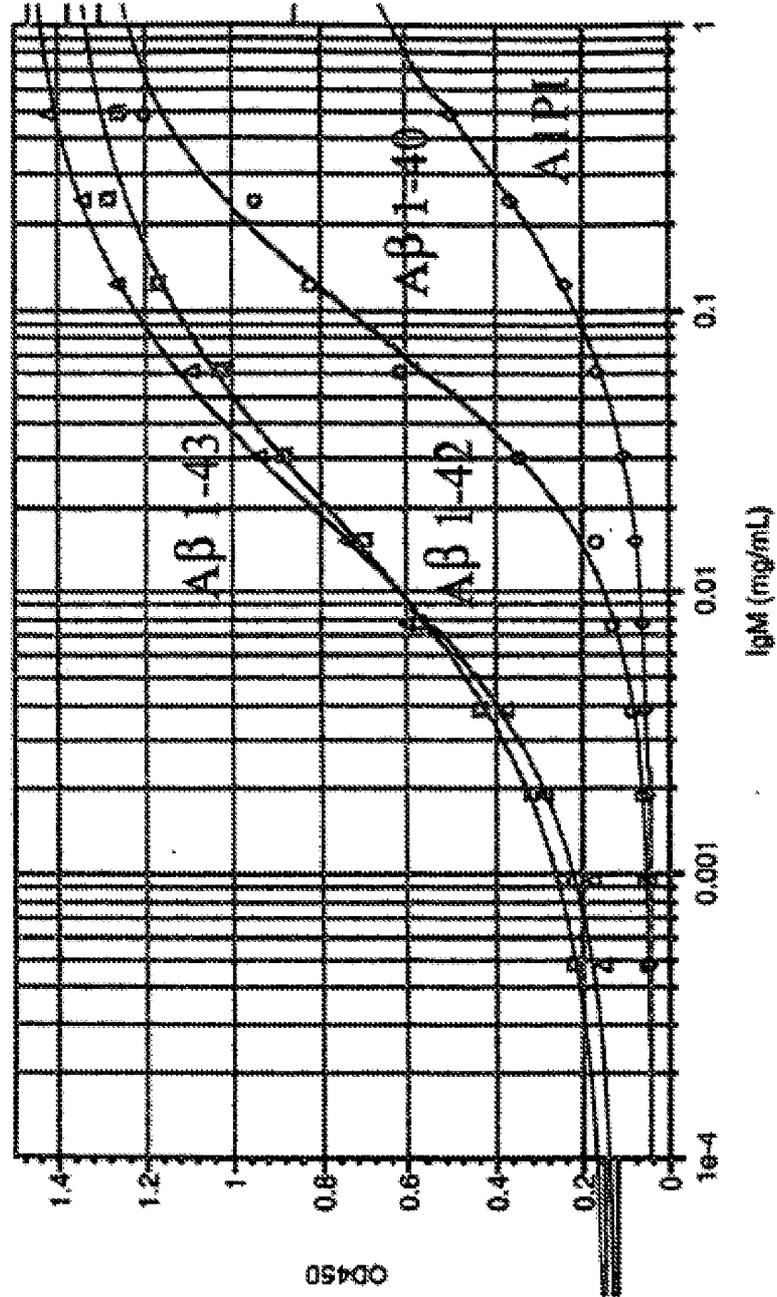


FIG. 10

Competição do terminal C de A β 1-42 com 0,07 mg/mL de IgM

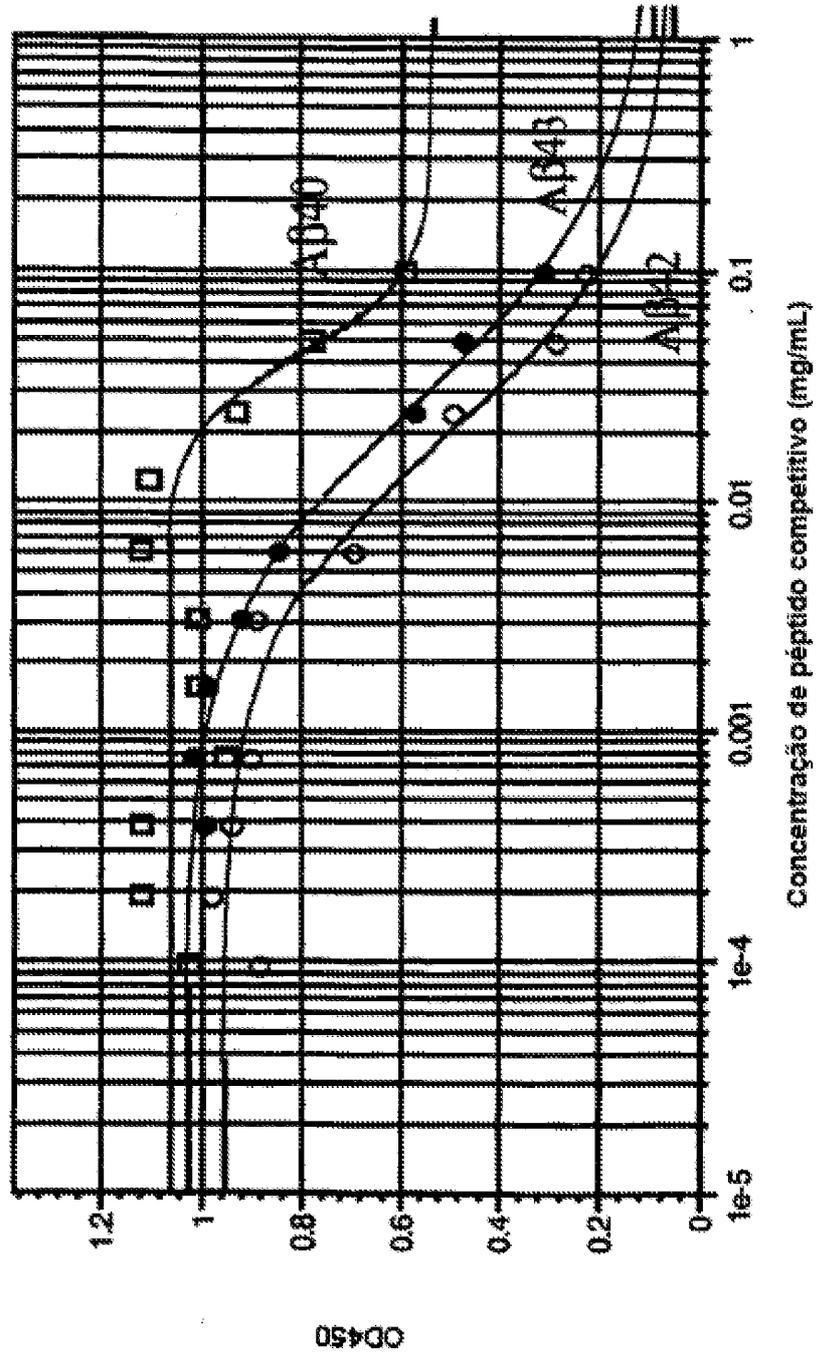


FIG. 11

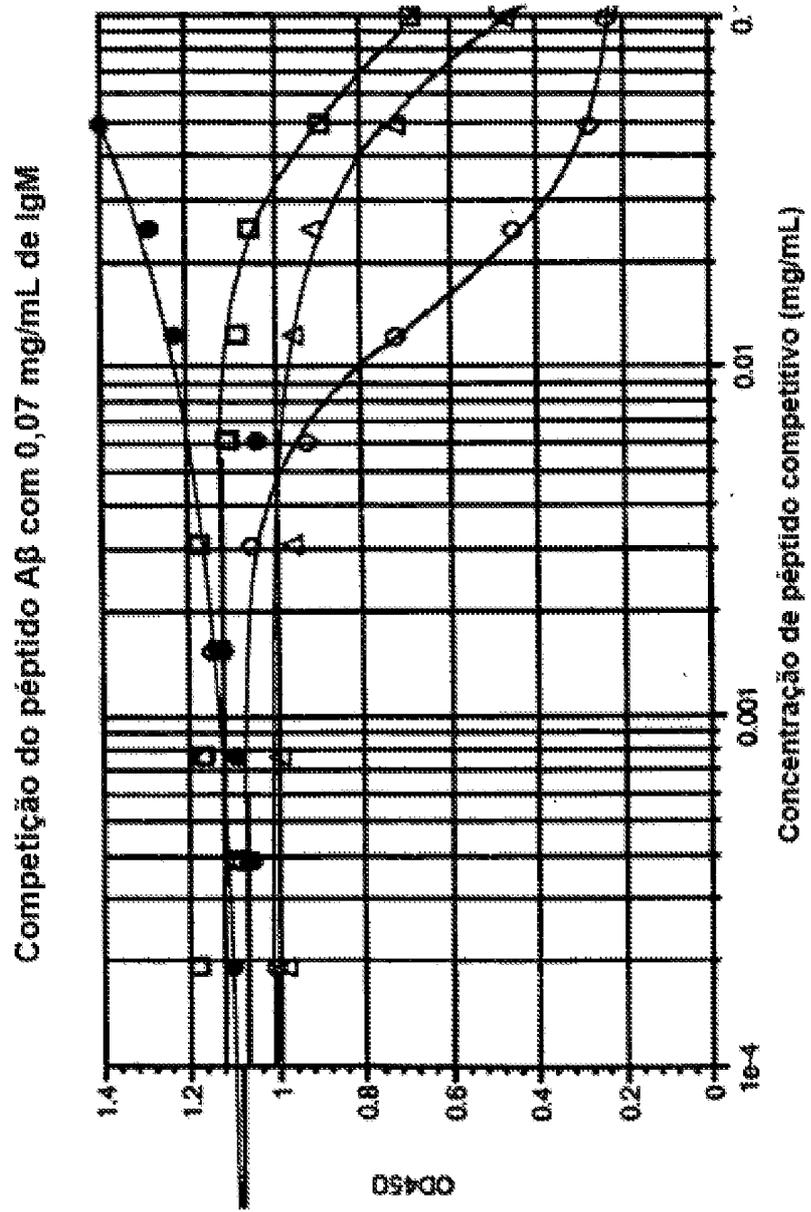


FIG. 12

Competição do péptido A β com 0,07 mg/mL de IgM

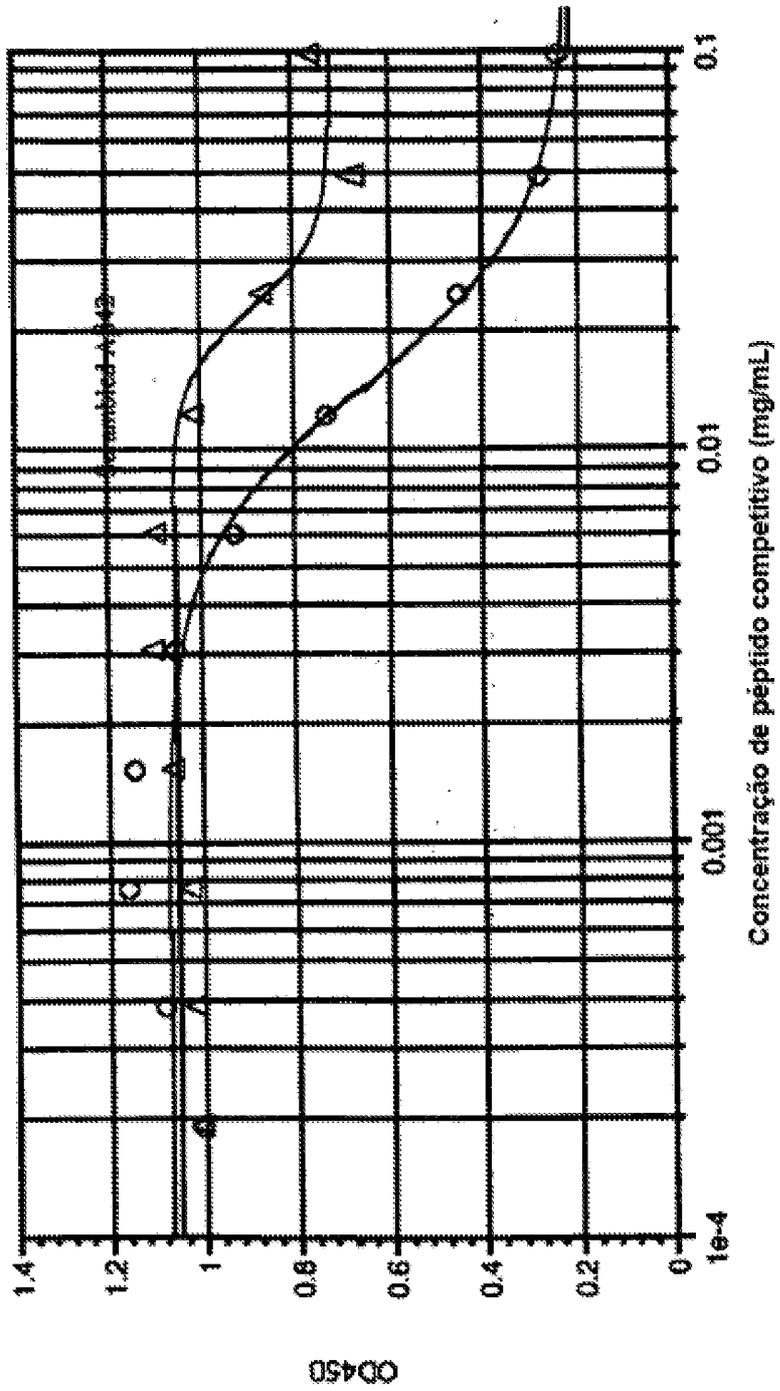
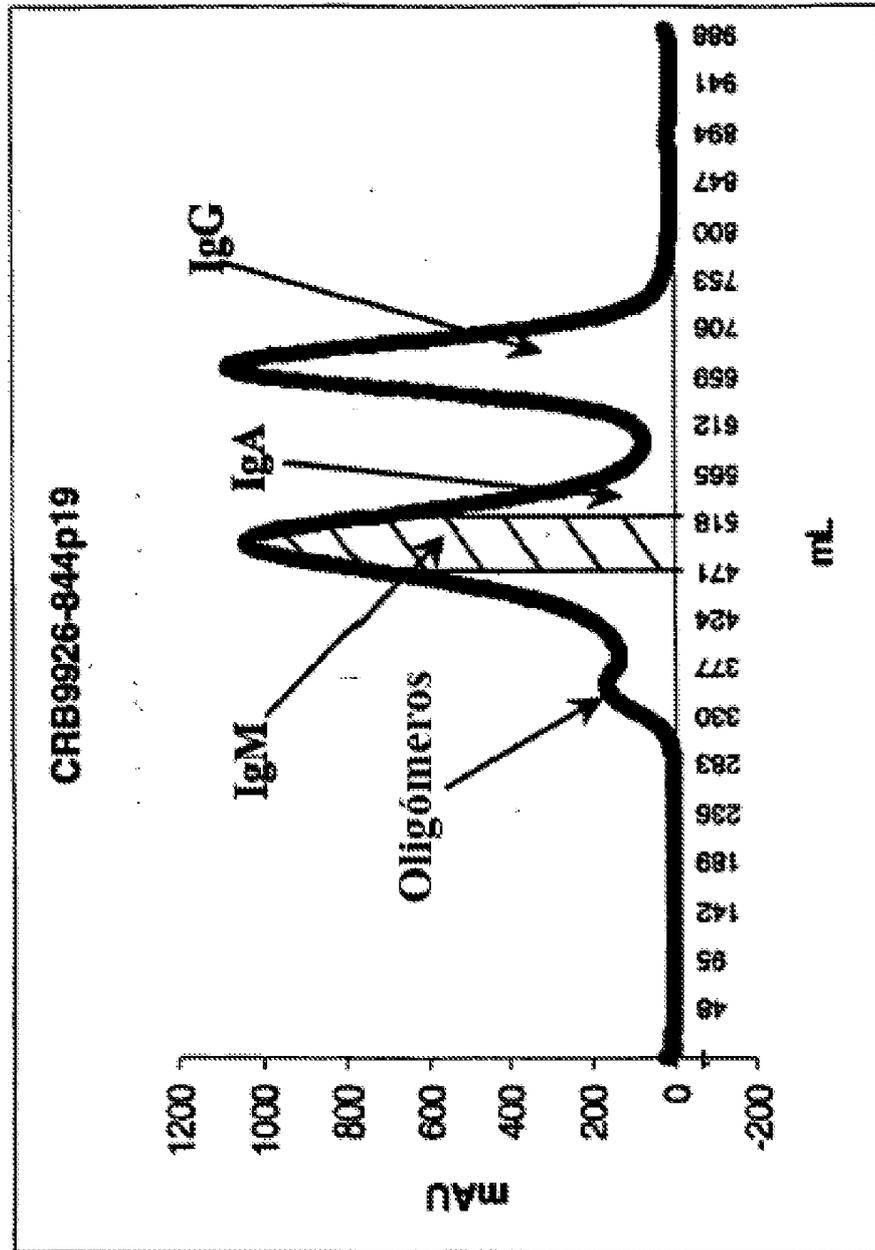


FIG. 13



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 03097093 A
- EP 1172378 A
- FR 2824568
- DE 9327112
- EP 0835880 A
- WO 9634099 A
- WO 9727296 A
- US 6307028 B, Lebing
- US 5554601 A
- US 5877399 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- DODEL, R et al. Intravenous Immunoglobulins containing antibodies against β -amyloid for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 2004, vol. 75, 1472-1474
- DODEL, R et al. Human antibodies against amyloid beta peptide: A potential treatment for Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.*, 2002, vol. 52, 253-258
- LEVY et al. *Science*, 1990, vol. 248, 1124-26
- ROZEMULLER et al. *Am. J. Pathol.*, 1993, vol. 142, 1449-57
- ROOS et al. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1991, vol. 640, 155-60
- TIMMERS et al. *Neurosci. Lett.*, 1990, vol. 118, 223-6
- HAAN et al. *Arch. Neurol.*, 1990, vol. 47, 965-7
- HAAN ; ROOS. *Clin. Neurol. Neurosurg.*, 1990, vol. 92, 305-310
- GLENNER ; MURPHY. *N. Neurol. Sci.*, 1989, vol. 94, 1-28
- FRANGIONE. *Ann. Med.*, 1989, vol. 21, 69-72
- HAAN et al. *Clin. Neuro. Neurosurg.*, 1992, vol. 94, 317-8
- FRASER et al. *Biochem.*, 1992, vol. 31, 10716-23
- CORIA et al. *Lab. Invest.*, 1988, vol. 58, 454-8
- WISNIEWSKI et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, vol. 179, 1247-54
- *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, vol. 180, 1528
- PRELLI et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990, vol. 170, 301-307
- WESTERMARK et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 3881-85
- WESTERMARK et al. *Am. J. Physiol.*, 1987, vol. 127, 414-417
- COOPER et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 8628-32
- COOPER et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 7763-66
- AMIEL. *Lancet*, 1993, vol. 341, 1249-50
- GLENNER ; WONG. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, vol. 120, 885-890
- GLENNER ; WONG. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, vol. 122, 1131-35
- GOLDGASER et al. *Science*, 1987, vol. 235, 8778-8780
- KANG et al. *Nature*, 1987, vol. 325, 733-736
- ROBAKIS et al. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 4190-4194
- TANZI et al. *Science*, 1987, vol. 135, 880-884
- LANGER. *Science*, 1990, vol. 249, 1527-1533
- TREAT et al. *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*. Liss, 1989, 353-385
- LOPEZ-BERESTEIN. *LIPOSOMES IN THE THERAPY OF INFECTIOUS DISEASE AND CANCER*. 317-327
- LANGER. *Softon, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.*, 1987, vol. 14, 201
- BUCHWALD et al. *Surgery*, 1980, vol. 88, 507
- SAUDEK et al. *N. Engl. J. Med.*, 1989, vol. 321, 574
- *Medical Applications of Controlled Release*. CRC Press, 1974
- **CONTROLLED DRUG BIOAVAILABILITY**. Drug Product Design and Performance. Wiley, 1984
- RANGER ; PEPPAS. *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.*, 1983, vol. 23, 81
- LEVY et al. *Science*, 1985, vol. 228, 190
- DURING et al. *Ann. Neurol.*, 1989, vol. 25, 351
- HOWARD et al. *J. Neurosurg.*, 1989, vol. 71, 105
- GOODSON. *Medical Applications of Controlled Release*, 1984, vol. 2, 115-138
- HSIAO et al. *Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. Science*, 1996, vol. 274, 99-102

- **IRIZARRY, M.** APPsw transgenic mice develop age-related A β deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1997, vol. 58, 965-73
- **FRAUTSCHY, S.A. et al.** The microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *Am. J. Pathol.*, 1988, vol. 152, 307-17
- **KLUNK, W. et al.** Staining of AD and Tg2576 mouse brain with X-34, a highly fluorescent derivative of chrysemine G and a potential in vivo probe for β -sheet fibrils. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 1997, vol. 23, 1638
- **PAPPOLLA, M.A. et al.** Evidence of oxidative stress and in vivo neurotoxicity of β -amyloid in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.*, 1996, vol. 152, 671-7
- **KHOLE, V. et al.** Identification of epididymis specific antigen by neonatal tolerization. *Am. J. Repro. Immunol.*, 2000, vol. 44, 350-356
- **SIGOUNAS, G. et al.** Half-life of polyreactive antibodies. *J. Clin. Immunol.*, 1994, vol. 14, 134-140
- **DODEL, R.C. et al.** Intravenous immunoglobulins containing antibodies against β -amyloid for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 2004, vol. 75, 1472-4