

(11) Número de Publicação: **PT 1067386 E**

(51) Classificação Internacional:
G01N 33/68 (2007.10) **G01N 33/50** (2007.10)
A61K 31/54 (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

| | | |
|--|--|---|
| (22) Data de pedido: 1996.03.25 | (73) Titular(es): WISTA LABORATORIES LTD. 51 AYER RAJAH CRESCENT, #07-01/02 SINGAPORE 139948 | SG |
| (30) Prioridade(s): 1995.03.27 GB 9506197 | | |
| (43) Data de publicação do pedido: 2001.01.10 | | |
| (45) Data e BPI da concessão: 2010.06.09 168/2010 | (72) Inventor(es): CLAUDE MICHEL WISCHIK CHARLES ROBERT HARRINGTON PATRICIA CAROL EDWARDS MARTIN ROTH AARON KLUG | GB GB GB GB GB |
| | (74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA | PT |

(54) Epígrafe: **INIBIÇÃO DA ASSOCIAÇÃO TAU-TAU**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO**"Inibição da associação tau-tau"**

A presente divulgação refere-se a novos métodos para a detecção de substâncias capazes de modular ou inibir a associação proteica patológica tau-tau e a agregação patológica de neurofilamentos. Os métodos do presente invento são particularmente úteis na pesquisa de substâncias para a profilaxia e tratamento da doença de Alzheimer.

A doença de Alzheimer (DA) é a causa única mais comum de demência em idade avançada (Livingstone (1994) *The scale of the problem*, Em: "Dementia" (eds. Burns e Levy) Chapman & Hall, London, págs. 21-35). Os indivíduos com a doença de Alzheimer são caracterizados por demência progressiva que apresenta com aumento da perda de memória, distúrbios no discernimento, percepção e fala e deterioração intelectual global (Roth e Iversen (1986) *Brit. Med. Bull.* 42 (volume especial)).

As principais características patológicas da doença de Alzheimer são as placas senis e emaranhados neurofibrilares, ambos contendo filamentos helicoidais emparelhados (PHF) dos quais a proteína associada a microtúbulos tau é um constituinte (Wischik *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4506-4510). As placas contêm também fibrilhas β -amilóides derivadas de uma anomalia ainda não definida no processamento da proteína amilóide precursora (APP; Kang *et al.* (1987) *Nature*, 325: 733-736).

Estudos da doença de Alzheimer apontaram para perda da proteína tau normal associada a microtúbulos (Mukaetova-Ladinska *et al.* (1993) *Am. J. Pathol.* 143: 565-578; Wischik *et al.* (1995a) *Neurobiol. Ageing* 16: 409-417; Lai *et al.* (1995b) *Neurobiol. Ageing* 16: 433-445), acumulação de filamentos helicoidais emparelhados patológicos (PHF; Mukaetova-Ladinska *et al.* (1993), *loc. cit.*; Harrington *et al.* (1994a) *Dementia*, 5: 215-228; Harrington *et al.* (1994b) *Am. J. Pathol.* 145: 1472-1484; Wischik *et al.* (1995a), *loc. cit.*) e perda de sinapses no córtex frontal médio (Terry *et al.* (1991) *Ann. Neurol.* 30: 572-580) como fortes marcadores discriminatórios

para o enfraquecimento cognitivo. A perda de sinapses (Terry *et al.*, *loc. cit.*) e a perda de células piramidais (Bondareff *et al.* (1993) *Arch. Gen. Psychiatry* 50: 350-356) estão ambas correlacionadas com medidas morfométricas de patologia neurofibrilar reactiva a tau e isto correlaciona-se ao nível molecular com uma redistribuição quase completa do banco de proteína tau da forma solúvel para a polimerizada (PHF) na doença de Alzheimer (Mukaetova-Ladinska *et al.* (1993), *loc. cit.*; Lai *et al.* (1995), *loc. cit.*). Uma possível explicação para estas alterações é a de que a redistribuição patológica da proteína tau em PHF causa uma falha do transporte axónico em circuitos de associação cortico-cortical através da incapacidade de manutenção da tubulina axónica no estado polimerizado dentro das células piramidais (Wischik *et al.* (1995a), *loc. cit.*; Wischik *et al.* (1995b), *Neurobiol. Ageing*, no prelo; Wischik *et al.* (1995c) "Structure, biochemistry and molecular pathogenesis of paired helical filaments in Alzheimer's disease". Eds. A. Goate e F. Ashall, no prelo; Lai *et al.* (1995), *loc. cit.*). Uma resultante falta de transporte de constituintes sinápticos do soma de projecção para o distante neocórtex de associação conduziria a perda sináptica e enfraquecimento cognitivo. Outros factores incluem a toxicidade directa da acumulação de PHF em células piramidais (Bondareff *et al.* (1993), *Arch. Gen. Psychiat.* 50: 350-356 (1994); *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 53: 158-164) e a possível toxicidade directa da acumulação de tau truncada que enfraquece a função celular (Mena *et al.* (1991), *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 50: 474-490).

Embora estudos de patogénese molecular em sistemas modelo tenham enfatizado o papel neurotóxico da acumulação de β -amilóide (revisto em Harrington e Wischik (1994) *Molecular Pathobiology of Alzheimer disease*. Em: "Dementia" (eds. A. Burns e R. Levy). Chapman & Hall London, págs. 211-238), as provas que ligam directamente a deposição de β -amilóide com o enfraquecimento cognitivo em humanos são fracas. É mais provável que o processamento alterado de APP seja apenas um dos vários factores possíveis que podem iniciar o processamento alterado da proteína tau. Outros factores de iniciação incluem processos desconhecidos associados a apoE4 (Harrington *et al.* (1994b), *loc. cit.*), trissomia do cromossoma 21 (Mukaetova-Ladinska *et al.* (1994) *Dev. Brain*

Dysfunct. 7: 311-329) e factores ambientais, tais como exposição prolongada a níveis sub-tóxicos de alumínio (Harrington *et al.* (1994c) *Lancet* 343: 993-997). Factores etiológicos distintos são capazes de iniciar um padrão comum de perturbação no processamento da proteína tau que inclui: truncamento do terminal C em Glu-391, formação de polímeros de tau PHF, perda de tau solúvel e acumulação de espécies anormalmente fosforiladas de tau (Wischik *et al.* (1996), *Int. Rev. Psychiat.*, no prelo).

O fragmento da proteína tau associada a microtúbulos que se mostrou ser um constituinte integral da estrutura central do PHF resistente a proteases é um fragmento de 93/95 resíduos de aminoácidos derivado do domínio de ligação a microtúbulos de tau (Wischik *et al.* (1988), *loc. cit.*; Kondo *et al.* (1988) *Neuron* 1: 827-834; Jakes *et al.* (1991) *EMBO J.* 10: 2725-2729; Novak *et al.* (1993) *Embo J.* 12: 365-370). A proteína tau existe em 6 isoformas de 352-441 resíduos de aminoácidos no cérebro adulto (Goedert *et al.* (1989) *Neuron* 3: 519-526). Em geral a estrutura da molécula de tau consiste num extenso domínio N-terminal de 252 aminoácidos, que se projecta do microtúbulo, uma região de repetições em cadeia de 93-125 resíduos que consiste em 3 ou 4 repetições em cadeia e que é o domínio de ligação aos microtúbulos e uma cauda C-terminal de 64 resíduos. Cada repetição em cadeia é composta por um segmento de ligação a tubulina de 19 resíduos e um segmento de ligação de 12 resíduos (Butner e Kirschner (1991) *J. Cell Biol.* 115: 717-730; Figura 1). O principal constituinte de tau que pode ser extraído de preparações enriquecidas na parte central de PHF resistente a proteases é um fragmento de 12 kDa derivado de ambas as isoformas de 3 e 4 repetições, mas restrito ao equivalente de 3 repetições em cadeia independentemente da isoforma (Jakes *et al.*, *loc. cit.*; Figura 2). As fronteiras N- e C-terminais do fragmento definem a extensão exacta da unidade característica da parte central resistente a proteases de tau PHF. É alterada na fase em 14/16 resíduos em relação à organização do unidor/ligador ("binder/linker") da molécula normal definida por Butner e Kirschner, *loc. cit.*, Figura 1 e é truncada no terminal C em Glu-391 ou numa posição homóloga na terceira repetição da isoforma de 4 repetições (Novak *et al.* (1993), *loc. cit.*; Figura 3). Está disponível um anticorpo monoclonal (mAb 423)

que reconhece especificamente este ponto de truncamento C-terminal e estudos histológicos utilizando este anticorpo mostraram a presença de proteína tau truncada no terminal C em Glu-391 em todos os estádios de degeneração neurofibrilar (Mena *et al.* (1995) *Acta Neuropathol.* 89: 50-56; Mena *et al.* (1996) *Acta Neuropathol.* (no prelo)). Assim, uma possível modificação pós-tradução implicada na agregação de PHF é uma proteólise anormal.

Foram desenvolvidos métodos que permitem a discriminação entre vários bancos de tau verificados em tecidos cerebrais de DA: tau solúvel normal, tau fosforilada e PHF resistentes a proteases (Harrington *et al.* (1990), (1991), (1994a) *loc. cit.*). Estes métodos foram desdobrados em estudos de DA grave e Síndrome de Down (Mukaetova-Ladinska *et al.* (1993; 1995), *loc. cit.*), em casos avaliados prospectivamente no estágio inicial de DA (Wischik *et al.* (1995a), *loc. cit.*; Lai *et al.* (1995), *loc. cit.*) e casos com outros diagnósticos neuropatológicos incluindo demência senil do tipo corpo de Lewy e doença de Parkinson (Harrington *et al.* (1994a), (1994b), *loc. cit.*). O teor de PHF global no tecido cerebral distingue inequivocamente doentes com e sem demência do tipo de Alzheimer. Existe globalmente uma diferença de 19 vezes no teor de PHF e no córtex temporal a diferença chega às 40 vezes. O local médio de acumulação de PHF é..., tal como esperado a partir dos estudos histológicos, não difere de controlos mais velhos em termos de acumulação de PHF resistentes a proteases ou de espécies de tau fosforiladas (Harrington *et al.* (1994a), (1994b), *loc. cit.*). Para além disso, a genotipagem da apolipoproteína E dos casos de corpo de Lewy cortical mostrou que a frequência do alelo E4 era aumentada para um nível semelhante ao observado em DA. Portanto, a presença do alelo E4 não pode a única causa da patologia de tau característica de DA, uma vez que esta não foi observada nos casos de corpo de Lewy (Harrington *et al.* (1994b), *loc. cit.*).

Um outro parâmetro que distingue casos com e sem DA é a quantidade de proteína tau solúvel normal. Embora os níveis de tau sejam superiores na substância branca que na substância cinzenta, tal como esperado para uma proteína associada a microtúbulos axónicos, a quantidade verificada na substância

cinzenta reflecte também uma inervação axónica aferente. Em DA, existe uma substancial perda de proteína tau solúvel normal que afecta todas as regiões do cérebro uniformemente (Mukaetova-Ladinska *et al.* (1993), *loc. cit.*). A base molecular deste declínio uniforme não é conhecida e não pode ser explicada por ARNm de tau reduzido (Goedert *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 4051-4055). O efeito líquido dos dois processos de acumulação de PHF e perda de tau solúvel é uma redistribuição anatómica do banco de proteína tau, de predominante na substância branca para predominante na substância cinzenta e de predominante frontal para predominante temporo-parietal.

A extensão global da redistribuição de proteína tau em DA pode ser apreciada a partir dos dados mostrados na Figura 4, onde os bancos de tau livre e ligada em PHF são comparados. Enquanto que nos controlos, 97% do banco de proteína tau está na fase solúvel, em DA 83% do banco de proteína tau encontra-se na fase insolúvel, quase inteiramente numa forma truncada e polimerizada em PHF (Mukaetova-Ladinska *et al.* (1993) *loc. cit.*). Um estudo do estágio inicial de DA em casos prospectivamente avaliados através do instrumento de diagnóstico clínico CAMDEX (Roth *et al.* (1986) *Brit. J. Psych.* 149, 698-709) e classificados *post-mortem* através dos critérios de estádios de Braak e Braak (1991), *Acta Neuropathol.* 82: 239-259 demonstrou que a perda de tau solúvel está directamente relacionada com a contagem do emaranhado e com a extensão da acumulação de PHF (Lai *et al.* (1995) *loc. cit.*).

Embora a tau anormalmente fosforilada tenha sido considerada um possível precursor de PHF (Lee *et al.* (1991) *Science* 251: 675-678; Goedert *et al.* (1994), em "Microtubules" (Hyams e Lloyd, eds.) págs. 183-200. John Wiley & Sons, NY), verificou-se que a tau normal era fosforilada em muitos dos locais anteriormente considerados anormalmente fosforilados na proteína tau associada a PHF (Matsuo *et al.* (1994) *Neuron* 13: 989-1002). No estudo do estágio inicial de DA, espécies de tau insolúveis hiperfosforiladas foram primeiro observadas após ter ocorrido uma apreciável redistribuição de tau em PHF (Lai *et al.*, 1995; Figura 5). Não houve provas de acumulação selectiva de espécies fosforiladas antes do aparecimento de

PHF, ou de emaranhados neurofibrilares (Lai *et al.* (1995) *loc. cit.*). Igualmente, não houve provas de que a tau fosforilada alimentasse o banco total ligado a PHF durante a progressão da patologia (Lai *et al.* (1995), *loc. cit.*). A fosforilação da proteína tau, até ao ponto em que é anormal, parece ser um processo secundário que afecta cerca de 5% dos PHF em qualquer estágio da patologia (Wischik *et al.* (1995a), (1995c), *loc. cit.*).

Os estudos do estágio inicial da doença de Alzheimer mostraram também que a taxa de transferência de tau solúvel para PHF é geométrica em relação ao nível de PHF, com um aumento progressivo na taxa de incorporação a maiores níveis ambientais de PHF (Lai *et al.* (1995), *loc. cit.*; Figura 6B). Para além disso, a taxa observada de perda de tau solúvel com a progressão da patologia não é suficiente para ser inteiramente responsável pela taxa observada de acumulação de PHF. Progressivamente mais síntese nova de tau é induzida à medida que o nível ambiente de tau solúvel cai abaixo de 580 pmol/g e esta também alimenta a agregação de PHF (Figura 6A). A taxa de agregação de PHF não é portanto determinada pelo estado ou concentração do precursor solúvel, que parece ser inteiramente normal mesmo em DA (Wischik *et al.* (1995a), (1995b), *loc. cit.*). Em vez disso, a taxa de transferência de tau solúvel para PHF é determinada pelo nível ambiente de PHF-tau, sugerindo que a modificação pós-tradução crítica responsável pela agregação de PHF ocorre no ponto de incorporação de tau no PHF.

Uma explicação provável para estas constatações é a de que a proteína tau sofra uma alteração conformacional induzida no ponto de incorporação no PHF, que está associada com a mudança de fase de metade da repetição na região de repetições em cadeia que foi anteriormente documentada (Novak *et al.* (1993), *loc. cit.*). Esta mudança conformacional poderia expor um local de captura de tau de elevada afinidade que permite a captura e modificação conformacional induzida de outra molécula de tau e por aí adiante. A mudança conformacional crítica na proteína tau que determina a taxa de agregação de PHF não necessitaria então de ser uma modificação química da tau solúvel, mas uma mudança conformacional induzida que é produzida pela ligação da proteína tau a um substrato

patológico. O processo podia ser iniciado por proteínas não tau, tais como um produto do metabolismo de APP (Caputo *et al.* (1992) *Brain. Res.* 597: 227-232) uma proteína mitocondrial modificada (Wallace (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8739-8746), etc. Uma vez iniciada a captura de tau, o processo podia continuar desde que a taxa de mais captura de tau excedesse a taxa de degradação do complexo patológico de tau. A degradação podia ser limitada pelo facto do complexo tau central do PHF ser resistente a proteases (Wischik *et al.* (1988), *loc. cit.*; Jakes *et al.*, *loc. cit.*). Um tal processo, uma "amiloidose da proteína tau", podia ser iniciado e progredir geometricamente sem qualquer modificação química interveniente da proteína tau solúvel, tal como normalmente se esperaria.

A Figura 7 representa esquematicamente a transformação da proteína tau em PHF na doença de Alzheimer. O constituinte proteico principal da parte central de PHF é uma forma de proteína tau que está truncada num fragmento de 93 resíduos que engloba uma versão com mudança de fase da região de repetições em cadeia da molécula de tau que funciona normalmente como domínio de ligação a microtúbulos. A agregação do PHF pode ser considerada como ocorrendo em resultado de uma sequência repetitiva de acontecimentos na qual a ligação patológica tau-tau desempenha um papel essencial. Esta ligação de tau livre é favorecida a uma concentração fisiológica apenas no caso assimétrico no qual uma molécula de tau sofreu já captura patológica (p. ex. para um produto do metabolismo de APP (Caputo *et al.* (1992) *Neurobiol. Ageing* 13: 267-274) ou uma proteína mitocondrial alterada (Jancsit *et al.* (1989) *Cell Motil. Cytoskel.* 14: 372-381; Wallace, *loc. cit.*) e outras ligações de tau são aumentadas através de processamento proteolítico parcial das espécies capturadas deixando apenas a unidade de tau truncada. Uma vez ligada uma unidade inteira ou truncada a uma molécula inteira, o processamento proteolítico parcial do complexo patológico resulta na produção de um dímero de unidades centrais de tau, com perda dos domínios N- e C-terminais da(s) molécula(s) anteriormente intacta(s). Os limites do processamento proteolítico são determinados pela região de associação tau-tau, que corresponde precisamente à unidade mínima de tau resistente a proteases que descrevemos (Novak *et*

al. (1993) *loc. cit.*; ver Figuras 16 e 17). No entanto, o resultado final desta proteólise parcial é o de reproduzir a unidade de tau central, que é capaz de capturar outra molécula de tau inteira. Este processo pode ser repetido indefinidamente. Exige dois passos chave para continuar até ao ponto de exaustão do banco de proteína tau disponível. O primeiro é a captura repetida da tau inteira pela unidade truncada, o segundo é o truncamento da tau inteira ligada para reproduzir a unidade central.

Até ao momento, não estão disponíveis métodos de confiança para a medição da associação patológica tau-tau e não foram descritas substâncias capazes de modular ou inibir a associação patológica tau-tau.

As soluções para os problemas técnicos anteriores são aqui descritas.

De acordo com isto, o presente invento descreve métodos para a detecção de agentes capazes de modular ou inibir a associação patológica tau-tau compreendendo o contacto de

- a) uma proteína tau ou um derivado desta contendo o fragmento central de tau com
- b) um agente suspeito de ser capaz de modular ou inibir a associação tau-tau e com
- c) uma proteína tau marcada ou um derivado desta marcado capaz de se ligar à proteína tau do passo a) ou com uma proteína tau ou um derivado desta que seja distinto da proteína tau do passo a) e também capaz de se ligar à proteína tau do passo a) e
- d) detecção da ligação tau-tau.

A modificação de tau que é responsável pela sua polimerização em PHF é propagada através de uma mudança física conformacional em vez de qualquer modificação química pós-tradução anterior de tau. Surpreendentemente, é possível transferir esta modificação que é induzida *in vivo* no momento da captura patológica de tau para o método *in vitro* de acordo com o processo de cima através de ligação inicial de tau a uma fase sólida. tau isolada do cérebro de rato recém-nascido era inteiramente incapaz de se ligar à unidade de tau central do

PHF (Figura 14; POFr). Mas a tau neonatal que tinha sido previamente ligada de forma passiva a uma matriz de fase sólida, foi induzida a ligar-se a proteína tau inteira não modificada com uma elevada afinidade idêntica à demonstrada com a unidade de tau central (Figuras 15 & 16). Assim, o factor crítico necessário para converter uma espécie de tau incapaz de ligação patológica, numa espécie capaz de capturar outra molécula de tau com elevada afinidade, é a mudança conformacional induzida pela ligação passiva da tau neonatal ao substrato da fase sólida. Isto demonstrou que a exposição ao local de captura de tau de elevada afinidade podia ser induzida fisicamente através da mudança conformacional que ocorre após ligação de tau a um substrato adequado e não necessita de qualquer outra modificação química.

De acordo com a presente divulgação, a ligação patológica que é reproduzida *in vitro* tinha certas propriedades críticas idênticas às observadas no cérebro humano. Isto é, em particular, que a proteína tau inteira ligada a uma unidade de tau central que termine em Ala-390 (Figura 21, SEQ ID No: 4) e portanto sem o Glu-391 necessário para reconhecimento pelo anticorpo monoclonal 423, podia ser feita reagir com mAb 423 após tratamento do complexo de tau ligada com a protease de amplo espectro, Pronase, de um modo que depende quantitativamente da extensão da digestão da Pronase (Figura 16). Pôde-se demonstrar que a perda dependente de digestão da imunoreactividade da tau N-terminal ocorre em paralelo com a aquisição da imunoreactividade a mAb 423 característica do PHF central (Figura 16). Assim, o requisito essencial necessário para a criação da unidade de tau isolada da parte central do PHF e produzida no cérebro na doença de Alzheimer é a interacção patológica tau-tau que foi reproduzida *in vitro*.

Ainda, ciclos repetitivos de ligação de tau inteira à unidade de tau central que termina em Ala-390, seguido de tratamento com Pronase, depois ligação de tau inteira e mais digestão de Pronase e por aí adiante até quatro ciclos, foram associados com a acumulação progressiva de tau truncada no terminal C em Glu-391 (Figura 17) e com a capacidade progressivamente aumentada de ligar mais tau inteira após cada ciclo (Figura 18). Isto demonstrou que o papel essencial da

proteólise no modelo representado na Figura 7 é o de evitar a saturação e deste modo facilitar a transformação progressiva ilimitada da tau solúvel em unidades de tau truncadas da parte central de PHF.

Tendo mostrado que todos os passos representados na Figura 7 podiam ser reproduzidos *in vitro* e que o requisito crítico para a progressão do processo era o passo de captura de tau de elevada afinidade, é possível demonstrar a utilização do ensaio de ligação para encontrar compostos capazes de bloquear a interacção tau-tau de elevada afinidade. A inibição competitiva de 20% pôde ser demonstrada quando os compostos inibidores mais potentes estavam presentes numa razão molar de 1:1 em relação a tau e verificou-se que mais inibição era aproximadamente linear na gama até à razão molar de 10:1 (Figura 19).

Uma vez que a região de repetições em cadeia funciona como um todo, é inesperado que seja possível demonstrar inibição competitiva selectiva da ligação patológica tau-tau sem interferência com a ligação normal de tau à tubulina através da mesma região da molécula. Um método de determinação de qualquer possível interferência, i.e. ligação de tau ou um derivado desta às moléculas de tubulina, compreende o contacto de uma preparação de tubulina despolimerizada, ou preparação de microtúbulos estabilizados com taxol com um agente suspeito de ser capaz de modular ou inibir a associação patológica tau-tau e um composto de tau mencionado no passo a) acima seguido de detecção da ligação tau-tubulina.

O termo "proteína tau" refere-se a qualquer proteína da família de proteínas tau acima mencionada e derivados destas. As proteínas tau são caracterizadas como uma família entre um grande número de famílias de proteínas que co-purificam com microtúbulos durante ciclos repetidos de agregação e desagregação (Shelanski *et al.* (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 765-768) e conhecidas como "proteínas associadas a microtúbulos" (MAP). A família tau caracteriza-se adicionalmente pela presença de um segmento N-terminal característico que é partilhado por todos os membros da família, sequências de 50 aminoácidos inseridas no segmento N-terminal, que são reguladas pelo desenvolvimento no cérebro,

uma região de repetições em cadeia característica que consiste em 3 ou 4 repetições em cadeia de 31-32 aminoácidos e uma cauda C-terminal (Figura 2).

Numa concretização preferida a proteína tau compreende a sequência de aminoácidos da Figura 21 (SEQ ID No: 5), referida como "T40" (Goedert *et al.* (1989), *Neuron* 3: 519-526) ou fragmentos desta e compreendendo a forma da proteína tau possuindo 2 inserções N-terminais e 4 repetições em cadeia.

O termo "fragmento central de tau" é definido na sua forma mais básica como um fragmento de tau compreendendo uma sequência de proteína tau truncada derivada da região de repetições em cadeia que nas condições apropriadas é capaz de se ligar à região de repetições em cadeia de uma outra proteína tau com elevada afinidade. Vulgarmente, as proteínas tau, derivados da proteína tau e fragmentos centrais da proteína tau preferidos possuem uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos 70% de igualdade da sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos da proteína tau humana correspondente (Figura 21, SEQ ID No: 5), de preferência pelo menos 80%, sendo preferível pelo menos 90% e caracterizam-se por serem capazes de se ligar ao fragmento central da tau humana. Uma concretização particularmente vantajosa do método de ensaio compreende o fragmento central de tau com a sequência de aminoácidos mostrada na Figura 22 (SEQ ID No: 6, Novak *et al.*, 1993). Este péptido de tau recombinante expresso por *E. coli in vitro* corresponde a espécies isoladas de preparações da parte central de PHF resistente a proteases (Wischik *et al.* (1988), *loc. cit.*; Jakes *et al.* (1991), *loc. cit.*). O termo "fragmento central de tau" inclui também derivados deste tal como descrito abaixo e mencionado na Figura 25 e 26 (SEQ ID No: 9 e 10).

Os termos "derivado da proteína tau" e "derivado do fragmento central de tau" compreendem fragmentos de proteínas tau de ocorrência natural ou não natural e proteínas relacionadas compreendendo pelo menos sequências parciais de aminoácidos que se assemelham à região de repetições em cadeia das proteínas tau, i.e., proteínas nas quais um ou mais dos aminoácidos da tau natural ou fragmentos seus foram substituídos ou eliminados sem perda da actividade de ligação.

Exemplos de proteínas de ocorrência natural com semelhança de sequência na região de repetições em cadeia são proteínas associadas a microtúbulos (MAP2; Figura 25 e 26; SEQ ID No: 9 e 10; Kindler e Garner (1994) *Mol. Brain Res.* 26: 218-224). Tais análogos podem ser produzidos através de métodos conhecidos de química de péptidos ou através de tecnologia de ADN recombinante.

Os termos "derivado da proteína tau" e "derivado do fragmento central de tau" compreendem derivados que podem ser preparados a partir dos grupos funcionais que ocorrem como cadeias laterais nos resíduos ou dos grupos N- ou C-terminais, através de meios conhecidos na arte. Estes derivados podem incluir ésteres alifáticos dos grupos carboxilo, amidas dos grupos carboxilo através de reação com amônia ou com aminas primárias ou secundárias, derivados N-acilo de grupos amino livres dos resíduos de aminoácidos formados com metades acilo (p. ex. grupos alcanóilo ou aroílo carbocíclico) ou derivados O-acilo de grupos hidroxil livres (por exemplo os dos resíduos serilo ou treonilo) formados com metades acilo.

O fragmento de tau central de PHF pode ser isolado a partir de tecidos cerebrais de AD através do método descrito em Wischik *et al.* (1988) (1995a), *loc. cit.*). O método depende de uma série de passos de centrifugação diferencial conduzidos em condições de tampão e densidade determinadas empiricamente, sendo o passo crítico final de centrifugação realizado num gradiente de densidade de sacarose contínuo que varia entre 1,05 e 1,18 de densidade e na presença de 10 µg/ml de Pronase, para produzir uma fracção de PHF central resistente a proteases na interface com uma almofada de cloreto de céσιο de elevada densidade. A proteína tau pode ser libertada do PHF central como uma preparação essencialmente pura no sobrenadante de pH 5,5 (acetato de amônio, 50 mmol) obtido após tratamento da preparação de PHF com ácido fórmico concentrado, liofilização e ultra-sons em tampão de pH 5,5.

A proteína tau solúvel normal pode ser isolada a partir de AD, tecidos cerebrais humanos de controlo ou de tecidos cerebrais animais, com um atraso *post-mortem* de menos de 3 horas. As proteínas de microtúbulos são obtidas através de três ciclos de agregação-desagregação dependentes da

temperatura de acordo com Shelanski *et al.* (1973, *loc. cit.*). A proteína tau é purificada a partir da fracção termoestável por filtração em gel (Herzog e Weber (1978) *Eur. J. Biochem.* 92: 1-8). Alternativamente, a proteína tau pode ser isolada através do procedimento de Lindwall e Cole (1984; *J. Biol. Chem.* 259: 12241-12245) com base na solubilidade da proteína tau em ácido perclórico a 2,5%.

A produção de proteínas tau e fragmentos pode ser ainda alcançada através de tecnologia de ADN recombinante convencional que está dentro das capacidades do artesão no campo. Tais técnicas são mais explicadas na literatura, ver p. ex. Sambrook, Fritsch & Maniatis "Molecular Cloning. A Laboratory Manual" (1989), Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. e Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publish. Association & Wiley Interscience.

Mais, moléculas de ADN ou fragmentos destas codificando proteínas tau completas ou parciais podem ser obtidas com a técnica de reacção em cadeia da polimerase (PCR). Os iniciadores que codificam as porções 3' e 5' das moléculas de ADN relevantes podem ser sintetizados para a proteína tau de interesse e podem ser utilizados para amplificar os membros individuais da família das proteínas tau.

A preparação de proteínas tubulina ou fragmentos destas é conhecida na arte e está descrita p. ex. por Slobada *et al.* (1976, em: "Cell Mobility" (R. Goldman, T. Pollard e J. Rosenbaum, eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, págs. 1171-1212).

As sequências de ADN e moléculas de ADN podem ser expressas utilizando uma grande variedade de combinações hospedeiro/vector. Por exemplo, os vectores de expressão úteis podem consistir em segmentos de sequências de ADN cromossómicas, não cromossómicas e sintéticas. Exemplos de tais vectores são os vectores virais, tais como os vários derivados conhecidos de SV40, vectores bacterianos, tais como plasmídeos de *E. coli*, ADN fágicos, tais como os numerosos derivados do fago λ , M13 e outros fagos filamentosos de ADN de cadeia simples, bem como vectores úteis em levedura, tais como derivados do plasmídeo de 2 μ , vectores úteis em células

eucarióticas, de preferência vectores úteis em células animais, tais como os que contêm sequências de ADN derivadas de SV40, adenovírus e/ou retrovírus.

Tal como aqui se utiliza, o termo "sequência de ADN" refere-se a um polímero de ADN, na forma de um fragmento separado ou como um componente de uma construção de ADN maior, que foi derivado de ADN isolado pelo menos uma vez numa forma substancialmente pura, i.e., isento de materiais endógenos contaminantes e numa quantidade ou concentração que permite a identificação, manipulação e recuperação da sequência e das suas sequências nucleotídicas componentes através de métodos bioquímicos padrão, por exemplo, utilizando um vector de clonagem. Tais sequências são de preferência proporcionadas na forma de um enquadramento de leitura aberto não interrompido por sequências internas não traduzidas, ou intrões, que estão tipicamente presentes em genes eucarióticos. No entanto, será evidente que o ADN genómico contendo as sequências relevantes podia também ser utilizado. Sequências de ADN não traduzido podem estar presentes a 5' ou 3' do enquadramento de leitura aberto, onde as mesmas não interferem com a manipulação ou expressão das regiões de codificação.

Tal como aqui se utilizam, os termos "vector de expressão" e "plasmídeo de expressão" referem-se a um plasmídeo compreendendo uma unidade transcricional compreendendo uma agregação de (1) um elemento ou elementos genéticos possuindo um papel regulador na expressão génica, por exemplo, promotores ou estimuladores, (2) uma sequência estrutural ou de codificação que é transcrita para ARNm e traduzida em proteína, e (3) sequências de iniciação e terminação da transcrição e tradução apropriadas. Os elementos estruturais pretendidos para utilização em vários sistemas de expressão eucariótica incluem de preferência uma sequência líder que permite a secreção extracelular da proteína traduzida por uma célula hospedeira. Alternativamente, quando a proteína recombinante é expressa sem uma sequência líder ou de transporte, esta pode incluir um resíduo de metionina N-terminal. Este resíduo pode opcionalmente ser subsequente clivado da proteína recombinante expressa para proporcionar um produto final.

A célula hospedeira utilizada para a expressão da sequência de ADN pode ser seleccionada a partir de uma variedade de hospedeiros conhecidos. Exemplos de tais hospedeiros são células procarióticas ou eucarióticas. Um grande número de tais hospedeiros está disponível a partir de vários depositários tais como a American Type Culture Collection (ATCC) ou o Deutsche Sammlung für Mikroorganismen (DSM). Exemplos de hospedeiros celulares procarióticos são estirpes bacterianas tais como *E. coli*, *B. subtilis* e outras. Os hospedeiros preferidos são células de mamífero comercialmente disponíveis tais como células 3T3 de ratinho, linhas celulares de neuroblastoma tais como NIE-115, N2A, PC-12 ou a linha celular de rim de Macaco Verde Africano COS transformada com SV40, etc.

A proteína tau produzida através de fermentação dos hospedeiros procarióticos e eucarióticos transformados com as sequências de ADN do presente invento pode então ser purificada até à homogeneidade essencial através de métodos conhecidos, tais como, por exemplo, através de centrifugação a diferentes velocidades, através de precipitação com sulfato de amónio, através de diálise (à pressão normal ou a pressão reduzida), através de focagem isoeléctrica preparativa, através de electroforese em gel preparativa ou através de vários métodos cromatográficos tais como filtração em gel, cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), cromatografia de troca iónica, cromatografia de fase inversa e cromatografia de afinidade (p. ex. em Sepharose[®] Blue CL-6B ou em anticorpos monoclonais ligados a um transportador).

De acordo com a presente divulgação, uma proteína tau ou um fragmento desta contendo o fragmento central de tau é incubada com uma proteína tau juntamente com um agente suspeito de ser capaz de modular ou inibir a associação patológica tau-tau. A extensão da ligação tau-tau que se correlaciona com a capacidade de inibição do agente pode ser detectada através de vários métodos:

Num método preferido uma proteína tau ou um fragmento desta contendo o fragmento central de tau é incubado com um derivado de tau que é diferente, de preferência imunologicamente diferente, da primeira proteína tau. Neste

caso, a ligação do derivado de tau é detectada por exemplo através de um anticorpo poli ou monoclonal ou de um derivado deste. Um exemplo para este tipo de detecção é um método de ensaio para a detecção de ligação tau-tau caracterizado por uma proteína tau truncada correspondendo ao fragmento central ser incubada juntamente com uma substância de teste e uma proteína tau inteira ou um fragmento da proteína tau truncado simulando a unidade de tau central de PHF na fase aquosa (Figuras 8 e 10).

Neste caso, a ligação tau-tau pode ser detectada imunoquimicamente de um modo convencional utilizando um anticorpo que reconheça o segmento N-terminal da proteína tau inteira ou, por exemplo, um anticorpo tal como mAb 423 que reconhece o fragmento central de tau truncado em Glu-391. Vantajosamente, o anticorpo monoclonal transporta ele próprio um marcador ou um grupo para conjugação directa ou indirecta com um marcador tal como aqui exemplificado mais adiante. Também, pode ser utilizado um anti-soro policlonal que tenha sido criado através de injeção do correspondente antigénio de tau num animal, de preferência um coelho, e recuperação do anti-soro através de purificação por imunoafinidade na qual o anticorpo policlonal é passado por uma coluna à qual está ligado o antigénio e eluindo o anticorpo policlonal de um modo convencional.

Uma concretização particularmente vantajosa do método da presente divulgação compreende a utilização de um anticorpo dirigido contra um segmento específico de humano entre Gly-16 e Gln-26 próximo do terminal N da proteína tau. A utilização deste tipo de anticorpo torna possível medir a ligação da tau humana recombinante inteira a isoformas de tau inteiras derivadas de outras espécies animais, por exemplo rato, em vários estádios de desenvolvimento. A ligação da tau truncada pode ser detectada através da utilização de um anticorpo tal como mAb 423 para detectar a ligação de um fragmento truncado central de tau que termine em Glu-391 a um fragmento semelhante que termine em Ala-390 não reconhecido por mAb 423 (Figura 8).

Os anticorpos ou fragmentos destes podem ser utilizados em qualquer sistema de imunoensaio conhecido na arte

incluindo, mas não se limitando a: radioimunoensaios, ensaios em "sanduíche", ensaios imunoenzimáticos (ELISA), imunoensaios fluorescentes, imunoensaios de proteína A, etc.

Particularmente preferida é a seguinte configuração para ensaios de ligação tau-tau (Figura 10): Um fragmento de tau, de preferência um fragmento de tau recombinante, que corresponde à unidade de tau truncada da parte central de PHF é ligado a uma fase sólida, p. ex. uma placa de ELISA convencional, em condições de tampão que se mostrou não favorecerem a associação tau-tau. A proteína tau truncada é de preferência ligada de forma passiva à fase sólida, uma vez que se verificou que esta expõe o local da ligação tau-tau de elevada afinidade dentro da região de repetições em cadeia. A fase sólida é habitualmente poli(cloreto de vinilo), mas pode ser outros polímeros tais como celulose, poliacrilamida, nylon, poliestireno ou polipropileno. Os suportes sólidos podem ser na forma de tubos, contas, discos ou microplacas ou quaisquer outras superfícies adequadas para a condução de um ensaio e que aquando da ligação passiva à proteína tau, expõe o local de captura de tau de elevada afinidade. Após a ligação, o complexo fase sólida-anticorpo é lavado em preparação para a amostra de teste.

Surpreendentemente, pôde-se determinar as condições de tampão apropriadas para ligação da unidade de tau truncada da parte central de PHF a um substrato sólido sem auto-associação e sem distúrbio do local de captura de tau de elevada afinidade dentro da região de repetições em cadeia. Foi estabelecido um sistema de ensaio tal como mostrado na Figura 8, no qual a unidade de tau central truncada em Ala-390 foi primeiro ligada à matriz da fase sólida. A seguir, foi incubada uma unidade truncada terminando em Glu-391. Apenas a última foi detectada como imunorreatividade a mAb 423. A Figura 9 demonstra a especificidade do ensaio, por a imunorreatividade a mAb 423 ser apenas observada na condição em que se espera a ligação tau-tau. Verificou-se que um tampão alcalino (carbonato de sódio, tris, etc.), de preferência pH 9-10, p. ex. tampão carbonato de sódio (50 mM, pH 9,6) estava associado com auto-associação desprezível das unidades centrais de tau (Figura 9). Portanto o plaqueamento da unidade de tau central para ligação passiva à matriz de fase sólida

foi efectuado neste tampão. Se desejado, pode ser plaqueada uma preparação de tubulina despolimerizada ou uma preparação de microtúbulos no mesmo tampão para ligação passiva para determinação da ligação tau-tubulina. Agentes adequados para bloquear o excesso de locais de ligação são o extracto lácteo, albumina de soro bovino, gelatina, etc. Após transferência da unidade central de tau ligada à fase sólida para condições de tampão fisiológicas e incubação com tau inteira no formato de ensaio de ligação padrão (Figura 10), foi possível demonstrar captura de afinidade extremamente elevada de proteína tau inteira normal. Não se observou ligação de tau inteira sem plaqueamento prévio da unidade central de tau na fase sólida. Quando ambas as espécies estavam presentes, observou-se que a ligação dependia da concentração de ambas as espécies. Verificou-se que quando as espécies da fase sólida ou da fase aquosa estavam em saturação, a constante de ligação para a outra espécie era de 8-25 nM, dependendo da isoforma específica de tau medida (Figura 11). As condições de tampão para a ligação tau-tau devem compreender concentrações salinas apropriadas e valores de pH adequados (Figuras 12 e 13). As concentrações salinas para a ligação tau-tau devem atingir de preferência 50 a 400 mM de cloreto de sódio, sendo preferível 100 a 200 mM de cloreto de sódio ou um sal ou mistura de sais correspondentes com uma força iónica comparável, p. ex. PBS (cloreto de sódio 137 mM, di-hidrogenofosfato de potássio 1,47 mM, hidrogenofosfato dissódico 8,1 mM, cloreto de potássio 2,68 mM). A gama de pH deve compreender valores de pH 4 a pH 10, sendo preferível de pH 5 a pH 8. Para saturar os excessivos locais de ligação e para evitar ligação não específica, a fase sólida pode ser incubada com um agente de bloqueio, p. ex. extracto lácteo, albumina de soro bovino ou de preferência gelatina. Após transferência da unidade de tau central ligada de forma passiva para condições de tampão fisiológicas, foi possível demonstrar captura de afinidade extremamente elevada de proteína tau inteira normal ($K_d = 8-25$ nM, dependendo da espécie de tau específica testada).

Uma fase líquida contendo uma proteína tau capaz de se ligar à proteína tau da fase sólida é adicionada juntamente com a substância de teste à proteína tau da fase sólida durante um período de tempo suficiente para permitir a ligação. O complexo da tau ligada é novamente lavado em

preparação para adição do anticorpo que detecta selectivamente a espécie de tau ligada secundariamente, mas não a espécie inicial da fase sólida. O anticorpo é ligado a uma molécula repórter, cujo sinal visível é utilizado para indicar a ligação da segunda espécie de proteína tau.

Alternativamente, a detecção de ligação pode ser efectuada com um segundo anticorpo capaz de se ligar a um primeiro anticorpo específico de tau não marcado. Neste caso, o segundo anticorpo é ligado a uma molécula repórter.

"Molécula repórter", tal como se utiliza no presente fascículo significa uma molécula que pela sua natureza química, proporciona um sinal analiticamente detectável que permite a detecção de anticorpo ligado ao antigénio. A detecção tem de ser pelo menos relativamente quantificável, para permitir a determinação da quantidade de antigénio na amostra, esta pode ser calculada em termos absolutos ou pode ser feita em comparação com um padrão (ou série de padrões) contendo um nível normal conhecido de antigénio.

As moléculas repórter mais vulgarmente utilizadas neste tipo de ensaio são enzimas ou fluoróforos. No caso de um imunoensaio enzimático uma enzima é conjugada com o segundo anticorpo, frequentemente através de glutaraldeído ou periodato. Tal como será prontamente reconhecido, no entanto, existe uma grande variedade de diferentes técnicas de conjugação, que são bem conhecidas dos artesãos peritos. Enzimas vulgarmente utilizadas incluem a peroxidase de rábano, glicose-oxidase, β -galactosidase e fosfatase alcalina, entre outras.

Os substratos a serem utilizados com as enzimas específicas são geralmente escolhidos para a produção, após hidrólise pela enzima correspondente, de uma mudança de cor detectável. Por exemplo, o p-nitrofenilfosfato é adequado para utilizar com conjugados de fosfatase alcalina; para conjugados de peroxidase, são frequentemente utilizados 1,2-fenilenodiamina ou tetrametilbenzidina. É também possível empregar substratos fluorogénicos, que produzem um produto fluorescente em vez dos substratos cromogénicos apontados acima. Em todos os casos, o anticorpo marcado com enzima é

adicionado ao complexo de proteína tau correspondente e deixa-se que se ligue ao complexo, depois o reagente em excesso é lavado. Uma solução contendo o substrato apropriado, peróxido de hidrogénio, é então adicionada ao complexo terciário de anticorpo-antigénio-complexo marcado. O substrato reage com a enzima ligada ao anticorpo, dando um sinal visual qualitativo, que pode ainda ser quantificado, normalmente espectrofotometricamente, para dar uma avaliação da quantidade de antigénio que está presente na amostra de soro.

Alternativamente, compostos fluorescentes, tais como fluoresceína ou rodamina, podem ser conjugados quimicamente com os anticorpos sem alterar a sua capacidade de ligação. Quando activados através de iluminação com luz de um determinado comprimento de onda, o anticorpo marcado com fluoróforo absorve a energia luminosa, induzindo um estado de excitabilidade na molécula, seguido de emissão da luz a um comprimento de onda maior característico. A emissão aparece como uma cor característica visualmente detectável com um microscópio óptico. Tal como no imunoensaio enzimático (EIA), deixa-se que o anticorpo marcado com fluorescência se ligue ao primeiro complexo anticorpo-tau-péptido. Após lavagem do reagente não ligado, o complexo ternário restante é então exposto a luz do comprimento de onda apropriado e a fluorescência observada indica a presença do antigénio.

Noutra concretização preferida, a segunda espécie de proteína tau que é adicionada em fase líquida juntamente com uma substância de teste pode ser ligada a uma molécula repórter tal como mencionado acima. A segunda espécie de tau pode ser directamente modificada (p. ex. marcada com um marcador radioactivo ou enzimaticamente detectável) ou conjugada (p. ex. com um fluoróforo) num domínio da molécula, por exemplo o segmento N-terminal, que se sabe não estar envolvido no local de ligação tau-tau de elevada afinidade e deste modo ela própria funciona tanto como ligando no ensaio de ligação tau-tau como molécula repórter.

Uma concretização particular preferida da presente divulgação está descrita em pormenor no Exemplo 1.

Os anticorpos ou fragmentos destes utilizados no método da presente divulgação podem ser produzidos através de técnicas convencionais, i.e. os anticorpos monoclonais que são selectivos para epítomos de tau podem ser preparados através do método de Köhler e Milstein. Os anticorpos monoclonais adequados para epítomos de tau podem ser modificados através de métodos conhecidos para proporcionar fragmentos Fab ou fragmentos (Fab')₂, concretizações de anticorpos quiméricos, humanizados ou de cadeia única.

Exemplos de anticorpos monoclonais úteis para medir a afinidade de ligação na interacção tau-tau e para demonstrar a relação imunoquímica entre a ligação demonstrada *in vitro* e a que ocorre no cérebro humano são apresentados no seguinte:

Anticorpos monoclonais que reconhecem um epítomo de tau N-terminal ou C-terminal permitem a medição da ligação entre espécies de tau truncadas e inteiras. Especialmente úteis são os anticorpos que reconhecem epítomos específicos humanos. Um anticorpo monoclonal (designado AK 499) reconhece um epítomo específico humano situado na região entre Gly-16 e Gln-26 de tau e deste modo permite também a medição da ligação entre espécies de tau inteiras, desde que uma seja derivada de uma fonte não humana (Lai (1995) "The role of abnormal phosphorylation of tau protein in the development of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease". Tese de Doutoramento, Universidade de Cambridge). O anticorpo 342 reconhece um epítomo de tau genérico não específico de uma espécie situado entre Ser-208 e Asn-265 (Figura 21, SEQ ID No: 4) que é parcialmente ocluído no decurso da interacção tau-tau (Lai, *loc. cit.*).

Outros anticorpos úteis foram já descritos: o anticorpo 423 reconhece tau truncada no terminal C em Glu-391 (Novak *et al.* (1993), *loc. cit.*). Este truncamento ocorre naturalmente no decurso da agregação de PHF na doença de Alzheimer (Mena *et al.* (1995), (1996), *loc. cit.*; Novak *et al.* (1993), *loc. cit.*; Mena *et al.* (1991), *loc. cit.*). O mesmo truncamento C-terminal pode ser demonstrado *in vitro* após ligação da tau inteira a um fragmento de tau truncado terminando em Ala-390, que não é reconhecido por mAb 423 (Novak *et al.* (1993) *loc. cit.*), seguido de digestão com a protease de largo espectro, Pronase

(Figura 16). Nesta configuração, a única fonte possível de imunorreactividade a mAb 423 é da digestão de tau inteira ligada e pode-se demonstrar que isto aumenta de um modo dependente da concentração com o aumento de Pronase (Figura 16). Isto demonstra que a conformação molecular da interacção de ligação tau-tau criada *in vitro* corresponde precisamente à que ocorre no cérebro e assim que a inibição selectiva da ligação demonstrada *in vitro* pode ser generalizada ao cérebro humano.

O anticorpo 7.51 reconhece um epítipo de tau genérico situado na antepenúltima repetição de tau (Novak *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5837-5841), que é ocluído quando tau se liga numa configuração imunoquímica semelhante a PHF mas que pode ser exposto após tratamento com ácido fórmico (Harrington *et al.* (1990), (1991), *loc. cit.*; Wischik *et al.* (1995a), *loc. cit.*). A tau solúvel normal ou a tau ligada a microtúbulos pode ser detectada por mAb 7.51 sem tratamento com ácido fórmico (Harrington *et al.* (1991), *loc. cit.*; Wischik *et al.* (1995a), *loc. cit.*). A ligação de tau inteira no ensaio de ligação tau-tau está associada com a oclusão parcial do epítipo de mAb 7.51.

Foram identificadas fenotiazinas que produziram uma inibição da ligação com uma K_i de 98-108 nM (Figura 19). Uma inibição de 20% pode ser demonstrada a uma razão molar de 1:1 em relação a tau e uma maior inibição é aproximadamente linear na gama de uma razão molar de até 10:1. Estas constatações são consistentes com as seguintes suposições: a ligação tau-tau é determinada por um número finito de locais de ligação saturáveis e é assim específica; não existe cooperatividade, i.e. que a ligação de uma molécula de tau não influencia a ligação de mais outra molécula de tau ao local no qual ocorre inibição; a ligação é reversível e está num estado de equilíbrio dinâmico no qual a ligação é determinada apenas pela concentração e afinidade de ligação.

Dado que a região das repetições em cadeia de tau funciona normalmente como domínio de ligação à tubulina e que a mesma região da molécula contém também o local de captura de tau de elevada afinidade responsável pela agregação de PHF, apenas seria possível considerar uma intervenção farmacêutica

para evitar a ligação patológica de tau se pudesse ser demonstrada uma diferença molecular mais subtil entre os dois tipos de ligação, o que permitiria inibição selectiva da interacção patológica tau-tau sem inibição da ligação normal tau-tubulina, uma vez que muitos processos celulares normais, incluindo particularmente o transporte axónico das vesículas sinápticas (Okabe e Hirokawa (1990) *Nature*, 343: 479-482) são dependentes da capacidade da célula para manter a tubulina no estado polimerizado. Experiências anteriores demonstraram diferenças imunoquímicas (oclusão do epítopo de mAb 7.51 na interacção de ligação tau-tau, mas sem oclusão na interacção de ligação tau-tubulina; Harrington *et al.* (1991) *loc. cit.*; Novak *et al.* (1991) *loc. cit.*) e diferenças moleculares (a tau ligada numa configuração semelhante a PHF mostra uma mudança de fase de 14/16 resíduos de aminoácidos em relação à organização normal segmento de ligação à tubulina/segmento de ligação do domínio de ligação à tubulina que pode ser demonstrada através de locais de clivagem proteolítica N- e C-terminais característicos (Novak *et al.* (1993), *loc. cit.*; Figura 3). Surpreendentemente, estas diferenças podem também proporcionar uma base para discriminação farmacêutica utilizando pequenas moléculas dentro de classes farmacêuticas bem estabelecidas. Em particular, os efeitos das fenotiazinas que se mostrou inibirem a associação patológica tau-tau foram testados para inibição da ligação normal tau-tubulina. Essencialmente não se pôde demonstrar qualquer inibição da ligação até uma razão molar de 1000:1 em relação a tau (Figura 20). Apesar disso, mostrou-se também que a hiperfosforilação de tau, que se mostrou inibir a interacção de ligação tau-tubulina, produz uma inibição comparável neste ensaio de ligação tau-tubulina (Lai, *loc. cit.*). Assim, os compostos proporcionados pelo presente invento que inibem a associação patológica tau-tau não inibem a ligação normal de tau à tubulina. Isto representa a constatação crítica do presente invento, uma vez que demonstra que a praticabilidade técnica para identificar compostos com base no sistema de pesquisa aqui descrito que pode distinguir farmacêuticamente entre a ligação patológica da região de repetições em cadeia no PHF e a ligação normal da região de repetições em cadeia na interacção tau-tubulina.

A única proteína associada a microtúbulos identificada até agora dentro da parte central de PHF é a proteína tau. Apesar disso, a agregação de PHF no compartimento somatodendrítico onde a proteína associada a microtúbulos predominante é MAP2 (Matus, A. Em "Microtubules" (Hyams e Lloyd, eds.) págs. 155-166, John Wiley and Sons, NY). As isoformas de MAP2 são quase idênticas à proteína tau na região de repetições em cadeia, mas diferem substancialmente na sequência e extensão do domínio N-terminal (Figuras 25 e 26, SEQ ID No: 9 e 10). Tal como mostrado no Exemplo 3, a agregação na região de repetições em cadeia não é selectiva para a sequência de aminoácidos central específica de tau e a actividade inibidora de inibidores de fenotiazina tais como tionina não é dependente de sequências únicas para tau.

Adicionalmente, a presente divulgação refere-se também aos métodos *in vivo* correspondentes. Estes métodos referem-se à pesquisa de agentes que modulem ou inibam a associação patológica tau-tau caracterizados pelo contacto de uma linha celular transfectada com proteína tau ou um derivado desta contendo o fragmento central de tau ou com um vector capaz de expressar uma proteína tau ou um derivado desta contendo o fragmento central de tau com um agente suspeito de ser capaz de modular ou inibir a associação tau-tau seguido de detecção da viabilidade da linha celular e/ou da morfologia da linha celular.

Os Exemplos 4 e 5 revelam que os fibroblastos são completamente viáveis quando expressam proteína tau inteira transgénica e que a distribuição no citoesqueleto da proteína tau inteira transgénica não é perturbada pela cultura das células com um potente inibidor da ligação tau-tau. A fenotiazina tionina não parece ter toxicidade intrínseca substancial. Mas os fibroblastos ou não são viáveis ou mostram anomalias morfológicas grosseiras quando expressam a unidade de tau central transgénica do PHF. A frequência de transfectantes viáveis e o nível de expressão da tau truncada aumentam de um modo dependente da dose crescendo as células em tionina após a transfecção. Os transfectantes viáveis que expressam a tau truncada são dependentes de tionina e revertem para formas anormais com baixa viabilidade após a sua retirada.

Estas constatações substanciam portanto num sistema de células não neuronais as principais constatações do presente invento, nomeadamente: que elevados níveis de tau central de PHF dentro da célula são tóxicos; que esta toxicidade pode ser revertida por compostos que sejam inibidores selectivos da interacção de ligação patológica tau-tau; e que tais compostos não rompem a ligação normal de tau à tubulina *in vivo*. Estas constatações são generalizáveis a outros modelos experimentais, incluindo sistemas de transfecção indutíveis e transfecção directa de células com proteína tau truncada.

Embora os resultados anteriores apoiem a utilização de inibidores da ligação tau-tau na reversão da toxicidade da unidade de tau truncada, é desejável estabelecer modelos neuronais destes processos. Em geral, as linhas celulares de neuroblastoma sofrem complexas mudanças do citoesqueleto no decurso da diferenciação que dependem de um equilíbrio entre o desenvolvimento da rede de microtúbulos e um correspondente desenvolvimento da rede de neurofilamentos. Pensa-se que as proteínas associadas a microtúbulos de maior peso molecular (MAP1A, MAP1B) proporcionam pontes cruzadas entre estes sistemas citoesqueléticos (Schoenfield *et al.* (1989) *J. Neurosci.* 9: 1712-1730). Sabe-se que a interferência directa no sistema de microtúbulos com agentes de despolimerização (Wisniewski e Terry (1967) *Lab. Invest.* 17: 577-587) ou alumínio (Langui *et al.* (1988) *Brain Res.* 438: 67-76) resulta em colapso dos filamentos intermédios com formação de espirais características no citoplasma (Wischik e Crowther (1986), *Br. Med. Bull.* 42: 51-56). Pode-se observar a ocorrência espontânea de uma agregação semelhante do citoesqueleto de neurofilamentos em linhas celulares de neuroblastoma que não se conseguem diferenciar. O papel das MAP na formação destes agregados não é actualmente compreendido. No entanto, a formação, acentuação e inibição destes agregados representam marcadores indirectos da capacidade do citoesqueleto microtubular para se associar com e transportar o citoesqueleto de neurofilamentos em neurites formadas de novo.

Os Exemplos 6 e 7 revelam que inibidores de fenotiazinas como a tionina não são tóxicos para linhas celulares neuronais a concentrações até 2 μM e a tionina não interfere com a

incorporação de proteína tau transgénica na rede de microtúbulos endógena. Estas fenotiazinas são necessárias para produção de linhas celulares neuronais viáveis após transfecção estável com um plasmídeo que expresse tau truncada. Para além disso, a expressão constitutiva de tau truncada acentua a formação de agregados de pNFH, enquanto que a última é inibida pela expressão de tau inteira. A formação de agregados citoplasmáticos de pNFH é inibida por fenotiazinas tais como tionina e a incorporação de imunorreactividade de pNFH em processos neuronais é facilitada por estes compostos.

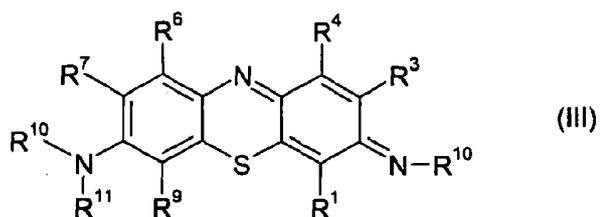
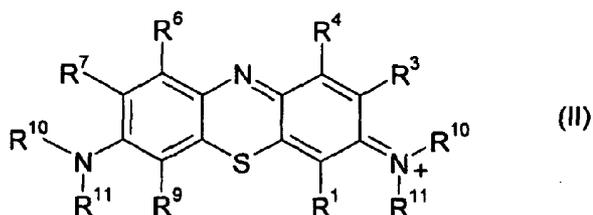
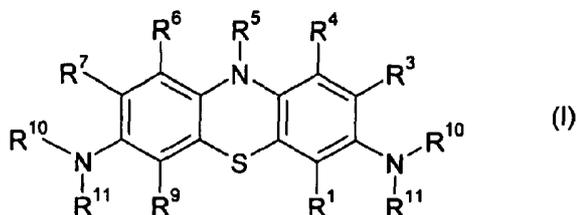
Estas constatações demonstram que a transfecção estável de linhas celulares neuronais com tau truncada é inerentemente tóxica e, através da desestabilização do sistema de microtúbulos em células sobreviventes, resulta na formação de presumíveis agregados de neurofilamentos que deixam de ser transportados para neurites em desenvolvimento. Estes efeitos podem ser inibidos por um composto seleccionado pela sua capacidade de bloquear a agregação tau-tau *in vivo* e esta acção é presumivelmente mediada por um efeito permissivo na expressão de tau endógena ou outras MAP necessárias para estabilizar os microtúbulos. As fenotiazinas tais como a tionina têm também a capacidade inesperada de bloquear a agregação de neurofilamentos em células não transfectadas, facilitando a diferenciação neuronal ou inibindo directamente a formação de agregados de neurofilamentos. Em adição à sua potencial utilidade na prevenção de agregação de tau na doença de Alzheimer, tais compostos podem ter potencial utilidade adicional no tratamento de doenças caracterizadas por agregação patológica de neurofilamentos, tal como doença dos neurónios motores e doença do corpo de Lewy. Verificou-se que ratinhos transgénicos que sobre-expressam subunidades de neurofilamentos desenvolviam agregados de neurofilamentos selectivamente nos grandes neurónios motores que sofrem degeneração, conduzindo a desperdício muscular e fraqueza (Cote *et al.* (1993) *Cell* 73: 35-46; Xu *et al.* (1993) *Cell* 73: 23-33). Outros distúrbios neurodegenerativos, doença de Pick e Paralisia Supranuclear Progressiva, mostram acumulação de agregados patológicos de tau truncada respectivamente no Girus Dentado e em células piramidais em estrela do neocórtex. Os

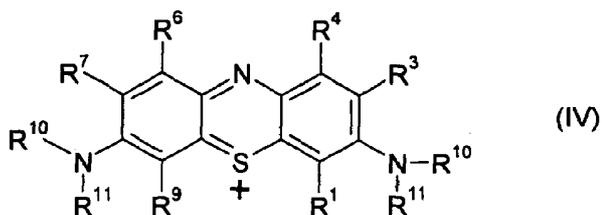
compostos que foram descritos têm também utilidade nestes distúrbios neurodegenerativos.

De acordo com isto, a presente divulgação refere-se especialmente ao método *in vivo* de cima em que a referida linha celular é de preferência um fibroblasto ou uma linha celular neuronal, sendo mais preferível uma linha celular de fibroblastos 3T3, uma PC-12 ou uma NIE-115. Estas linhas celulares são transfectadas de preferência com uma proteína tau truncada, contendo pelo menos a unidade central de tau. A expressão da proteína tau pode estar sob controlo constitutivo ou indutível ou a espécie de proteína tau pode ser directamente transfectada.

O presente invento refere-se a compostos que modulam ou inibem a associação tau-tau tal como obtidos através de qualquer método acima descrito.

Com base nos resultados de cima, o presente invento proporciona também a utilização de fenotiazinas de fórmula:





em que:

R_1, R_3, R_4, R_6, R_7 e R_9 são seleccionados independentemente a partir de hidrogénio, halogéneo, hidroxí, carboxi, alquilo, haloalquilo ou alcoxi substituídos ou não substituídos;

R_5 , cada R_{10} e cada R_{11} são, independentemente, seleccionados a partir de hidrogénio, hidroxí, carboxi, alquilo, haloalquilo ou alcoxi substituídos ou não substituídos;

e seus sais farmacologicamente aceitáveis,

para utilização na profilaxia ou tratamento de uma doença neurodegenerativa de agregação patológica tau-tau por inibição da referida associação patológica tau-tau sem inibição da ligação normal tau-tubulina.

O termo "alquilo" tal como aqui se utiliza refere-se a grupos lineares ou ramificados, de preferência possuindo de um a oito, sendo preferível um a seis, átomos de carbono. Por exemplo, "alquilo" pode referir-se a metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, isopentilo, terc-pentilo, hexilo, iso-hexilo e semelhantes. Substituintes adequados para os grupos alquilo substituídos utilizados no presente invento incluem grupos mercapto, tioéter, nitro, amino, arilo, halogéneo, hidroxí e carbonilo bem como arilo, cicloalquilo e grupos heterocíclicos não arilo.

Os termos "alcoxi" referem-se a grupos tal como definido acima como grupos alquilo, conforme seja o caso, que possuem também um átomo de oxigénio interposto entre eles e o resíduo do substrato ao qual estão unidos.

O termo "haloalquilo" representa uma cadeia de alquilo linear ou ramificada possuindo um a quatro átomos de carbono com 1, 2 ou 3 átomos de halogéneo ligados a este. Grupos haloalquilo típicos incluem clorometilo, 2-brometilo, 1-cloroisopropilo, 3-fluoropropilo, 2,3-dibromobutilo, 3-cloroisobutilo, iodo-t-butilo, trifluorometilo e semelhantes.

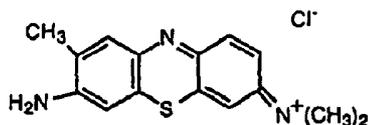
O "halogéneo" representa flúor, cloro, bromo ou iodo.

Alguns compostos do presente invento possuem um ou mais átomos de carbono substituídos assimetricamente e existem portanto em formas racémicas e opticamente activas. Pretende-se que o presente invento englobe as formas racémicas dos compostos bem como qualquer uma das formas opticamente activas destes.

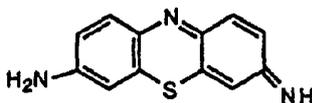
Os sais de adição ácida farmacologicamente aceitáveis são formados entre compostos básicos de fórmula (I) e ácidos inorgânicos, p. ex. ácidos halídricos tais como ácido clorídrico e ácido bromídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, etc., ou ácidos orgânicos, p. ex. ácido acético, ácido cítrico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido metanossulfónico, ácido p-toluenossulfónico, etc.

São especialmente preferidas as seguintes fenotiazinas:

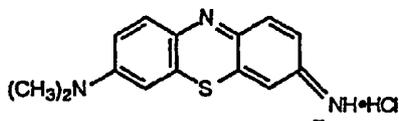
a) Azul de Toluidina O



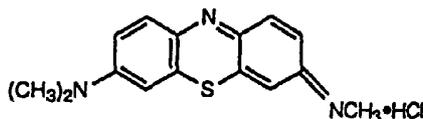
b) Tionina



c) Azul Azure A

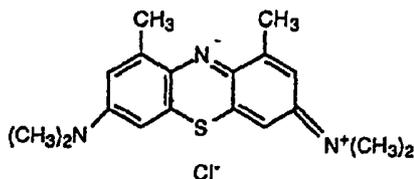


d) Azul Azure B



e

e) 1,9-Dimetil-Azul de Metileno



Os compostos preferidos, úteis para o bloqueio da associação patológica tau-tau, de preferência fenotiazinas (Figuras 23 e 24), são caracterizados por um coeficiente de ligação de menos de 0,4 e ausência de inibição no ensaio de ligação tau-tubulina, de preferência até uma razão molar de 1000:1 em relação à concentração molar de tau.

As fenotiazinas do presente invento são conhecidas na arte e podem ser fabricadas através dos processos referidos em textos padrão (p. ex. Merck Manual, Houben-Weyl, Beilstein E III/IV 27: 1214 ff, *J. Heterocycl. Chem.* 21: 613 (1984), etc.).

Os compostos da fórmula de cima, seus sais farmacologicamente aceitáveis ou outros compostos que se verifique terem as propriedades definidas nos ensaios proporcionados, podem ser utilizados como medicamentos após mais testes de toxicidade (p. ex., na forma de preparações farmacêuticas). A utilização farmacêutica anterior de azul de metileno numa grande variedade de indicações médicas foi descrita, incluindo o tratamento de meta-hemoglobinemia e a profilaxia da psicose maníaco-depressiva (Naylor (1986) *Biol. Psychiatry* 21: 915-920) e a penetração no SNC após administração sistêmica foi descrita (Müller (1992) *Acta Anat.* 144: 39-44). A produção de Azure A e B ocorre como produtos normais de degradação metabólica do azul de metileno (Disanto e Wagner (1972a) *J. Pharm. Sci.* 61: 598-602; Disanto e Wagner (1972b) *J. Pharm. Sci.* 61: 1086-1094). A administração de farmacêuticos pode ser efectuada parentericamente tal como

oralmente, na forma de comprimidos, comprimidos revestidos, drageias, cápsulas de gelatina duras ou macias, soluções, emulsões ou suspensões), nasalmente (p. ex. na forma de vaporizadores nasais) ou rectalmente (p. ex. na forma de supositórios). No entanto, a administração pode também ser efectuada parentericamente tal como intramuscularmente ou intravenosamente (p. ex. na forma de soluções injectáveis).

Para o fabrico de comprimidos, comprimidos revestidos, drageias e cápsulas de gelatina duras os compostos de fórmula I e os seus sais de adição ácida farmacologicamente aceitáveis podem ser processados com excipientes farmacologicamente inertes, inorgânicos ou orgânicos. Podem ser utilizados lactose, amido de milho ou derivados destes, talco, ácido esteárico ou os seus sais, etc., por exemplo, como tais excipientes para comprimidos, drageias e cápsulas de gelatina duras.

Os excipientes adequados para cápsulas de gelatina macias são, por exemplo, óleos vegetais, ceras, gorduras, polióis semi-sólidos e líquidos, etc.

Os excipientes adequados para o fabrico de soluções e xaropes são, por exemplo, água, polióis, sacarose, açúcar invertido, glicose, etc.

Os excipientes adequados para soluções injectáveis são, por exemplo, água, polióis, glicerol, óleos vegetais, etc.

Os excipientes adequados para supositórios são, por exemplo, óleos naturais ou endurecidos, ceras, gorduras, polióis semi-sólidos ou líquidos, etc.

Para além disso, as preparações farmacêuticas podem conter agentes conservantes, solubilizantes, substâncias que aumentam a viscosidade, agentes estabilizadores, agentes humidificadores, agentes emulsionantes, agentes adoçantes, agentes corantes, agentes aromatizantes, sais para variar a pressão osmótica, tampões, agentes de revestimento ou antioxidantes. Podem também conter ainda outras substâncias terapêuticamente valiosas.

De acordo com o invento os compostos com a fórmula de cima e seus sais farmacologicamente aceitáveis podem ser utilizados no tratamento ou profilaxia da doença de Alzheimer, por inibição da associação patológica tau-tau. A dosagem pode variar dentro de amplos limites e será, evidentemente, adaptada aos requisitos individuais em cada caso particular. Em geral, no caso de administração oral deve bastar uma dosagem diária de cerca de 50 mg a cerca de 700 mg, de preferência cerca de 150 mg a cerca de 300 mg, divididos de preferência em 1-3 doses unitárias, que podem, por exemplo, ser da mesma quantidade. Será, no entanto, notado que o limite superior dado acima pode ser excedido quando se verificar ser indicado.

O presente invento pode ser mais bem compreendido quando for lido em conjunto com as Figuras anexas:

Figura 1: Representação da ligação da proteína tau a microtúbulos (modificada segundo Butner e Kirschner, *loc. cit.*).

Figura 2: Representação esquemática das isoformas da proteína tau, com as sequências de aminoácidos e de ADNc correspondentes mostradas na Figura 21. O domínio N-terminal de 252 resíduos contém uma ou duas inserções que adicionam mais 58 resíduos ("1", "2"), seguido por uma região de repetições em cadeia de 93-125 resíduos contendo 3 ou 4 repetições e uma cauda C-terminal de 64 resíduos. Os fragmentos de tau isolados de preparações enriquecidas na parte central de PHF resistente a proteases são designados "F5.5" e consistem numa mistura de espécies derivadas de ambas as isoformas de 3 e 4 repetições, mas englobando 93-95 resíduos, o equivalente a 3 repetições, de fase deslocada em 14-16 resíduos em relação à organização normal da cadeia da região de repetições em cadeia. Todas as espécies de F5.5 e a tau normal são reconhecidas por mAb 7.51, mas mAb 423 reconhece apenas os fragmentos F5.5 que terminam em Glu 391. São também mostradas as posições dos epítomos para os mAb 499, AT8 e 342.

Figura 3: A análise da sequência N-terminal do fragmento de 12 kDa F5.5 libertado das preparações da parte central de

PHF revelou a presença de 6 péptidos distintos que podem ser agrupados em 3 pares derivados das isoformas de 3 repetições (A: repetições 1-3; SEQ ID No: 1) ou 4 repetições (B: repetições 1-3; SEQ ID No: 2, ou C: repetições 2-4; SEQ ID No: 3) (Jakes *et al.*, *loc. cit.*). A imunorreatividade a mAb 423 serve para definir uma fronteira C-terminal em Glu-391 (mostrada através de uma seta, Novak *et al.* (1993), *loc. cit.*). As fronteiras N- e C-terminais servem assim para definir um faseamento da região de repetições em cadeia dentro da parte central de PHF que é deslocada em 14-16 resíduos em relação às repetições com homologia de sequência. Esta unidade mínima de tau da parte central de PHF resistente às proteases tem 93/95 resíduos de comprimento o que é precisamente equivalente a 3 repetições. As fronteiras desta unidade estão também fora de fase em relação aos domínios de ligação à tubulina propostos por Butner e Kirschner (*loc. cit.*), que são mostrados sublinhados.

Figura 4: Teor total de proteína tau em controlos e na doença de Alzheimer. A tau solúvel normal (branco) é a forma predominante verificada nos controlos, enquanto que na doença de Alzheimer, a forma predominante de tau está polimerizada em PHF (preto).

Figura 5: Mudanças na tau solúvel, tau fosforilada e contagem de emaranhados durante os estádios iniciais da doença de Alzheimer (Lai *et al.* (1995), *loc. cit.*). A acumulação de tau ligada a PHF é mostrada no eixo horizontal. Isto é acompanhado por uma perda relativa da tau solúvel normal. A primeira aparição de tau fosforilada está intimamente ligada à primeira aparição de emaranhados. No entanto, ambos aparecem apenas após já ter ocorrido uma redistribuição substancial de tau da fase solúvel para a polimerizada.

Figura 6: Taxas calculadas da transferência de nova síntese de tau para um banco de tau solúvel (a), e de tau solúvel para o banco de ligada a PHF (b) em estádios iniciais da doença de Alzheimer (Lai *et al.* (1995) *loc. cit.*). À medida que o nível de tau solúvel cai abaixo de 580 pmol/g, é progressivamente necessária mais nova síntese de tau para manter o passo com a taxa de produção de PHF e isto parece ser regulado através de um modo de retroacção negativa em relação

ao nível ambiente da tau solúvel (a). A taxa de transferência de tau solúvel para PHF é geométrica em relação ao nível ambiente de PHF-tau (b).

Figura 7: Cenário hipotético para transformação de proteína tau em PHF na doença de Alzheimer. Uma vez a tau imobilizada e truncada, é exposto um local de captura patológica de tau de elevada afinidade. Quando é capturada outra molécula de tau, apenas é possível uma degradação proteolítica parcial, uma vez que a região da associação tau-tau de elevada afinidade está protegida de proteólise, deixando um outro local de captura de tau de elevada afinidade para a captura de outra molécula de tau. A redistribuição do banco de proteína tau solúvel para a fase ligada a PHF truncada é autocatalítica, mediada pela captura repetitiva de tau de elevada afinidade e proteólise parcial.

Figura 8: Configuração do ensaio de ligação de tau no qual é medida a ligação de duas unidades truncadas. A espécie que termina em Ala-390 ("a") é primeiro utilizada para revestir a placa de ELISA (em tampão carbonato de sódio: 50 mM, pH 9,6). A seguir, uma segunda espécie de tau truncada terminando em Glu-391 ("e") é incubada em várias condições de tampão mostradas na Figura 9. Apenas a espécie "e" é reconhecida por mAb 423 e assim a imunoreactividade a mAb 423 mede apenas a tau que é ligada durante a segunda incubação.

Figura 9: Ligação da espécie "e" (0 ou 20 µg/ml) a "a" (0 ou 10 µg/ml) em solução salina tamponada com fosfato ("normal"), água destilada ("água") e tampão carbonato de sódio ("carbonato", 50 mM, pH 9,6). O eixo vertical mostra a imunoreactividade a mAb 423. Não se detecta imunoreactividade quando a espécie "a" é utilizada como revestimento sozinha, porque o mAb 423 não reconhece "a". Não se detecta imunoreactividade quando "e" é incubada sem antes se plaquear "a". Isto é porque as condições de bloqueio utilizadas evitam a ligação não específica de "e" à placa de ELISA. A imunoreactividade é apenas observada na condição em que "a" e "e" estão ambas presentes, demonstrando a detecção específica apenas de "e" que foi ligada a "a". Não se observa ligação quando "e" é adicionada em tampão carbonato de sódio. Portanto, esta condição representa a condição óptima para o

plaqueamento inicial de "a", uma vez que a auto-agregação é minimizada nesta condição.

Figura 10: Configuração padrão para a medição da ligação de tau inteira ("t") à unidade de tau central truncada anteriormente ligada de forma passiva à fase sólida ("a"). Um fragmento de tau recombinante ("a") correspondendo à unidade de tau truncada da parte central de PHF é plaqueado a várias concentrações numa placa de ELISA em condições que se mostrou não favorecerem a associação tau-tau (Figura 9). Após o bloqueio, a tau recombinante inteira ("t") é plaqueada em condições que permitem a detecção selectiva da ligação tau-tau. A ligação é detectada através de um anticorpo apropriado, que reconhece um epítopo situado próximo do terminal N da tau inteira. Este anticorpo não reconhece "a".

Figura 11: Determinação da K_d para a ligação de tau inteira ("T40") à unidade de tau central truncada que termina em Ala-390 ("a"), utilizando mAb 499 para medir a tau humana inteira ligada. O eixo horizontal no gráfico superior mostra a concentração de T40 utilizada e o eixo vertical mostra a imunoreactividade a mAb 499. Cada curva de ligação é obtida a uma concentração de plaqueamento de "a" que é mostrada. Sem "a", não existe ligação, confirmando a ausência de ligação não específica de T40 nas condições de ensaio utilizadas. A ligação depende da concentração de T40 e da concentração de "a". A figura inferior mostra a K_d calculada que corresponde a cada concentração de plaqueamento de "a". À medida que a concentração de "a" se torna maior, as condições de saturação são assintoticamente alcançadas e isto representa a K_d de saturação para a ligação de T40 à unidade de tau central truncada, determinada nesta experiência como 22,8 nM.

Figura 12: Utilizando o formato de ensaio padrão mostrado na Figura 10, com a espécie "a" utilizada como revestimento a 10 $\mu\text{g/ml}$ e T40 adicionada às concentrações mostradas (gama de 0-50 $\mu\text{g/ml}$), a ligação foi medida a pH constante (pH 7,4), enquanto se variava a concentração de cloreto de sódio. Observa-se um patamar na vizinhança da concentração salina fisiológica de 137 mM. A ligação é reduzida a concentrações salinas moderadamente baixas e altas, embora a ligação se torne mais favorável a uma concentração salina muito baixa.

Figura 13: Experiência semelhante à mostrada na Figura 12, mantendo a concentração de cloreto de sódio constante a 137 mM, mas variando o pH na gama de 0-10, mostrando-se a ligação em solução salina normal fisiológica tamponada com fosfato ("PBS", pH 7,4) para comparação. A ligação é reduzida a extremos de pH. A ligação mostrada foi detectada pelos mAb 499 e 342.

Figura 14: Conjuntos típicos de curvas de ligação utilizando a unidade de tau central truncada "a" na fase sólida e incubando tau inteira que foi ("T40P") ou não ("T40") fosforilada *in vitro* utilizando o método de Biernat *et al.* (1992) *EMBO J.* 11: 1593-1597. A K_d foi reduzida em 10 vezes através da fosforilação nesta experiência, e embora variando o estado de fosforilação nas fases aquosa e sólida sistematicamente, pode-se mostrar que o efeito global da fosforilação é de em média 20 vezes a inibição da ligação. Embora tenha sido proposto por alguns um estado fetal de fosforilação como importante para a determinação de ligação patológica tau-tau, mostra-se aqui que quando a tau fetal de rato ("POTr") é introduzida na fase aquosa é incapaz de ligação patológica à unidade de tau central.

Figura 15: Em contraste com a Figura 14, após a tau fetal se ligar passivamente à fase sólida, é capaz de se ligar a tau não fosforilada inteira. Um conjunto típico de curvas de ligação é mostrado em A, variando a concentração de tau inteira ("T40") e tau fetal (P0 tau") nas gamas de concentração mostradas. É mostrada a K_d assintótica derivada em B. Tal como com a ligação de tau inteira à unidade de tau central truncada, a ligação da tau inteira à tau fetal imobilizada tem a mesma K_d de 20 nM. Assim a tau fetal, que não se liga a tau quando está presente na fase aquosa (Figura 14), é convertida numa espécie que se liga a tau simplesmente através de ligação passiva à fase sólida. Assim a ligação passiva de tau a uma matriz sólida expõe o local de captura de tau de elevada afinidade.

Figura 16: Comparação dos valores de K_d no ensaio de ligação tau-tau utilizando a espécie mostrada nas fases aquosa ou sólida. A fosforilação da tau recombinante inteira

utilizada na fase aquosa inibe a ligação num factor de 10 vezes e a tau fetal/de recém-nascido de rato não se liga, tal como mostrado na Figura 14. Quando a tau de recém-nascido é utilizada na fase sólida, T40 liga-se com a mesma afinidade que à unidade central truncada de PHF. A fosforilação de T40 na fase aquosa produz uma inibição de 30 vezes da ligação. A hiperfosforilação da tau de recém-nascido na fase sólida inibe a ligação numa extensão comparável e a hiperfosforilação em ambas as fases produz uma inibição de 50 vezes da ligação. Portanto, ao contrário da hipótese de fosforilação, a fosforilação inibe a auto-agregação patológica da proteína tau em todas as configurações do presente ensaio.

Figura 17: Digestão proteolítica da proteína tau inteira agregada. (A) tau inteira (20 µg/ml) foi ligada a dGA (20 µg/ml) em PBS, lavada e incubada durante 5 min com Pronase em água às concentrações indicadas. A imunorreactividade foi medida com os mAb 342 (▲), 499 (o) e 423 (●). (B) tau inteira (10 µg/ml) que se auto-agregou na fase sólida na ausência de dGA foi digerida de forma semelhante e a imunorreactividade foi medida com os mAb 342 (▲) e 423 (●). Em ambos os casos, a perda de imunorreactividade dependente da concentração de protease com ambos os mAb 499 e/ou 342 ocorreu com a aquisição de imunorreactividade ao mAb 423. (C) Os resultados de (A) são representados esquematicamente. A dGA truncada, inicialmente utilizada para revestir a fase sólida eclodida, liga-se a tau inteira com elevada afinidade pela interacção através da região de repetições. Ambas as espécies não têm o epítipo de mAb 423 antes da digestão. A digestão proteolítica do complexo (linhas ponteadas) remove a porção N-terminal da molécula de tau inteira com perda dos epítipos dos mAb 499 e 342 localizados tal como mostrado. A aquisição de imunorreactividade com o mAb 423 indica truncamento da tau inteira em Glu-391. A extensão exacta do terminal N do complexo proteoliticamente estável é desconhecida, mas exclui o epítipo de mAb 342 imediatamente adjacente à região de repetições e inclui o domínio de ligação a tau.

Figura 18: Acumulação de tau truncada através de captura repetitiva de tau. Começando com o fragmento truncado de tau (dGA, 20 µg/ml) na fase sólida, tau humana recombinante

inteira (20 $\mu\text{g/ml}$) foi ligada, digerida com Pronase (1 ng/ml) durante 5 min, lavada e a preparação foi novamente incubada com mais tau inteira (20 $\mu\text{g/ml}$) e novamente digerida. Este ciclo de ligação/digestão foi repetido quatro vezes; a imunoreactividade a mAb 499 foi medida antes e depois e a mAb 423 medida apenas depois de cada passo de digestão com Pronase. (A) A digestão com Pronase do complexo foi associada a uma acumulação crescente de proteína tau truncada em Glu-391 na fase sólida após cada ciclo de digestão. (B) A ligação da tau inteira foi detectada através do aparecimento de imunoreactividade para o terminal N de tau (mAb 499), que foi inteiramente abolida pela digestão com Pronase. No ciclo de incubação subsequente, a capacidade de ligação foi aumentada para a tau inteira incubada a uma concentração constante na fase aquosa. A imunoreactividade crescente a mAb 499 não pode ser explicada através de imunoreactividade residual deixada do ciclo anterior. Assim o complexo proteoliticamente estável deixado após a digestão com Pronase mantém a capacidade de se ligar a mais tau e esta capacidade de ligação aumenta à medida que se acumula tau truncada na fase sólida.

Figura 19: Ligação tau-tau relativa (eixo vertical) na presença de concentrações crescentes de fenotiazinas inibidoras protótipo (eixo horizontal). Esta inibição pode ser expressa em termos de um modelo padrão de inibição competitiva, com uma K_i calculada de 98-108 nM. Os coeficientes de correlação para estas aproximações são de 0,99 e são altamente significativas estatisticamente, tal como mostrado.

Figura 20: Inibição selectiva da ligação tau-tau pela tionina. A proteína tau truncada foi utilizada a 489 nM em ambas as fases aquosa e sólida do ensaio tal como na Figura 8 (círculos a cheio). No ensaio de tau-tubulina, tubulina despolimerizada foi utilizada como revestimento a 200 nM (círculos vazios) e a tau foi incubada a 400 nM. Os dados de ligação podiam ser descritos matematicamente através de um modelo padrão que assume inibição competitiva no local de captura de tau de elevada afinidade. Os valores de K_i foram calculados utilizando os valores de K_d obtidos a partir dos estudos de ligação correspondentes utilizando tau inteira. Os

pontos dos dados representam a média de medições em quadruplicado.

Figura 21: Sequências nucleotídica e de aminoácidos prevista de uma isoforma de proteína tau humana (SEQ ID No: 4). A sequência, deduzida a partir do clone de ADNc httau40, difere da forma de três repetições determinada anteriormente (Goedert et al. (1988), *loc. cit.*) em 58 aminoácidos extra inseridos na região amino-terminal (sublinhado) e na repetição extra de 31 aminoácidos descrita anteriormente (Goedert et al. (1989), *EMBO J.* 8: 393-399) (sublinhado). Os nucleótidos estão numerados na direcção 5'-3'. O clone de ADNc httau40 (Goedert et al. (1989b), *Neuron* 3: 519-526) contém a sequência de cima inserida num local *NdeI* (extremidade 5') e num local *EcoRI* a 3' da terminação do codão (**).

Figura 22: Sequências de aminoácidos e de ADNc da unidade de tau central de PHF (SEQ ID No: 6; Novak et al. (1993), *loc. cit.*) e iniciadores (SEQ ID No: 7 e 8) utilizadas na construção da unidade de tau central preferida.

Figura 23: Classificação de compostos por inibição da interacção tau-tau. A classificação baseia-se na ligação normalizada relativamente à observada na ausência de composto tomada como a média observada a 1 e 10 µg/ml. Nesta classificação, "1" representa uma ligação equivalente à observada na ausência de composto, enquanto que "0,2" indica que a ligação foi reduzida para uma média de 20% a concentrações de composto de teste de 1 e 10 µg/ml. Assim quanto menor for o número mais eficaz é o composto na inibição da ligação de e e a. Tal como pode ser observado, as primeiras cinco fenotiazinas têm coeficientes de ligação normalizados de menos de 0,4. Isto é, a ligação observada na gama de 1-10 µg/ml é menos de 40% da observada na ausência de composto.

Figura 24: Estruturas químicas dos compostos testados com valores para ligação normalizada de acordo com a Figura 23.

Figura 25: Representação esquemática de tau, MAP2 (forma adulta), MAP2C (forma juvenil) e tau de elevado peso molecular (verificada no sistema nervoso periférico e em linhas celulares de neuroblastoma). Estas proteínas partilham

domínios de ligação a microtúbulos semelhantes, mas diferem substancialmente na sequência e extensão do domínio de projecção N-terminal. As formas juvenis de tau e MAP2 têm apenas 3 das repetições em cadeia. Existe também uma forma de 4 repetições de MAP2.

Figura 26: Diferenças das sequências na região de repetições em cadeia da tau humana (linha superior; SEQ ID No: 9) e MAP2 humana (linha inferior; SEQ ID No: 10). As setas verticais mostram os limites do fragmento central truncado de PHF que termina em Glu-391 e os segmentos de ligação à tubulina são mostrados sublinhados.

Figura 27: O vector de expressão pIF2 é um vector de expressão eucariótico baseado em SV40 (pSV2neo; Sambrook et al. (1989), *loc. cit.*; SEQ ID No: 11 e 12) modificado para conter um promotor de β -globina a conduzir a expressão do ADN estranho (M.N. Neuberger). Possui um marcador de resistência à neomicina para selecção em Genética.

Figura 28: Células fibroblastos 3T3 de ratinho transfectadas com PIF2::T40, que expressam proteína tau humana inteira (T40), imunomarcadas através de mAb 7.51 (figura superior) e mAb 499 (figura inferior). As células formam apófises delgadas longas e observa-se que a imunoreactividade de tau tem também uma distribuição citoesquelética no pericarion.

Figura 29: Células fibroblastos 3T3 de ratinho transfectadas com PIF2::dGAE, que expressam o fragmento central de tau truncado de PHF que termina em Glu-391, imunomarcadas com mAb 7.51. Linha celular inicial transfectada e crescida sem tioniina. As células são grosseiramente anormais, multinucleadas, com vacúolos, contendo agregados de proteína tau no citoplasma.

Figura 30: Transferências de Lipofectina/proteína tau para células 3T3 transfectadas com PIF2::T40. A sobrevivência celular relativa (normalizada para contagem de células após tratamento com Lipofectina sem proteína) é mostrada para concentrações aproximadamente equimolares de tau inteira (T40, 220 nM) e truncada (dGAE, 300 nM), sem (não sombreado) ou com

(sombreado) tionina a 3,5 μM . A tau truncada é mais tóxica que a tau inteira ($p = 0,02$), apesar do facto de a concentrações equimolares, a carga de proteína total ser 5x maior no caso da tau inteira.

Figura 31: (A) Reversão da toxicidade da tau truncada. A toxicidade da tau truncada transferida através de Lipofectina para células 3T3 que expressam tau inteira é dependente da concentração. A tionina (linha contínua) reverteu significativamente a toxicidade observada na ausência de tionina (linha tracejada) em todas as três concentrações de tau truncada, (B) Experiência semelhante na qual foi transferida tau inteira através de lipofectina para células 3T3 que expressam a inteira. Ambos os efeitos de toxicidade e da tionina foram muito menos evidentes.

Pretende-se que os seguintes Exemplos ilustrem pormenores do presente invento, sem deste modo limitá-lo de qualquer modo.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Ensaio de ligação tau-tau

O ensaio é efectuado numa placa de microtítulo de 96 poços em PVC, com soluções adicionadas e leituras tomadas em relação a cada um dos poços:

a) É adicionada a cada poço uma solução de 50 μl de péptido tau truncado purificado a concentrações variáveis que variam de 0-50 $\mu\text{g/ml}$ (0, 1, 5, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$) em tampão carbonato de sódio 50 mM (pH 9,6) e incubada 1 h a 37°C.

b) Os poços da placa de microtítulo são lavados 3x com água com ou sem Tween[®] a 0,05%.

c) É adicionada a cada poço uma solução de 200 μl de extracto lácteo a 2% ("Marvel") feita em solução salina normal tamponada com fosfato ("PBS", cloreto de sódio 137 mM, di-hidrogenofosfato de potássio 1,47 mM, hidrogenofosfato

dissódico 8,1 mM, cloreto de potássio 2,68 mM) e incubada durante 1 h a 37°C.

d) A placa é lavada tal como em b).

e) É adicionada a cada poço uma solução de 50 µl de tau recombinante inteira (T40) na mesma gama de concentrações que em a) acima em gelatina a 1%, Tween® a 0,05% em PBS e incubada durante 1 h a 37°C.

f) A placa é lavada tal como em b).

g) É adicionada a cada poço uma solução de 50 µl de anticorpo monoclonal 499 numa diluição de 1/2 do sobrenadante da cultura de tecidos com extracto lácteo a 2% ("Marvel") em PBS e incubada durante 1 h a 37°C.

h) A placa é lavada tal como em b).

i) É adicionada a cada poço uma solução de 50 µl do segundo anticorpo (IgG (H+L) de cabra anti-ratinho purificado por afinidade com pureza para "blotting" conjugado com peroxidase de rábano - número de catálogo Biorad 170-6516) numa diluição de 1/1000 em PBS com Tween® a 0,05% e incubada durante 1 h a 37°C.

j) A placa é lavada 3x com uma solução de Tween® a 0,05% em água, seguido de uma lavagem simples com água.

k) A preparação da solução de revelação de cor é tal como se segue. Dissolver 10-15 mg de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB; número de catálogo BCL 784974) em dimetilsufóxido para uma concentração final de 10 mg/ml (solução de TMB). Adicionar 10 ml de solução-mãe de acetato de sódio (0,5 M, pH 5,0) a 90 ml de água. Enquanto se agita em remoinho adicionar lentamente 1 ml de solução de TMB seguido de 10 µl de peróxido de hidrogénio.

l) É adicionada uma solução de 50 µl de solução de TMB a cada poço para revelar a reacção colorida da peroxidase, cuja taxa de revelação é lida durante 2 min. a 650 nm, num leitor

Molecular Devices Microplate utilizando o pacote de suporte lógico Kinetic L1 Softmax.

Exemplo 2: Preparação de fragmentos de tau recombinantes

Foi criado ADNc de tau utilizando protocolos padrão (Sambrook, *et al.*, *loc. cit.*) a partir de ARNm isolado de tecido cerebral de um doente de Alzheimer cujo tecido foi obtido 3 h após a morte. A biblioteca de ADNc foi pesquisada com sondas oligonucleotídicas de 17-mero sintéticas derivadas da sequência de parte de uma proteína central de PHF (Goedert *et al.* (1988), *loc. cit.*). Os clones de ADNc inteiros foram subclonados no local *EcoRI* de M13mp18 e foi utilizada mutagénese dirigida ao local para introduzir um local *NdeI* no contexto do codão iniciador. Após clivagem com *NdeI* e *EcoRI*, os fragmentos de ADNc resultantes foram subclonados a jusante do promotor da ARN-polimerase T7 no plasmídeo de expressão pRK172 cortado com *NdeI/EcoRI* (McLeod *et al.* (1987) *EMBO J.* 6: 729-736). pRK172 é um derivado de pBR322 que é propagado num número muito elevado de cópias em *E. coli* devido à remoção da região de controlo do número de cópias de pBR322. O plasmídeo possui um gene de resistência à ampicilina para selecção de clones recombinantes.

Foram preparadas construções que codificam para formas truncadas de tau a partir de ARNm tal como descrito em Novak *et al.* (1993) *loc. cit.*). O ARNm foi utilizado como molde para a reacção em cadeia da polimerase (RCP) (PCR) utilizando iniciadores oligonucleotídicos específicos. O iniciador com sentido continha um local *NdeI* e o anti-sentido, um local *EcoRI*. Os fragmentos de PCR foram subclonados em pRK172 tal como descrito acima. Os iniciadores utilizados para construção de dGAE são dados na Figura 22. A autenticidade de todos os fragmentos de ADN utilizados para expressão foi confirmada através de sequenciação completa de ambas as cadeias.

Os detalhes para a construção de ADNc de httau40 ("T40") estão descritos em Goedert *et al.* (1989) *loc. cit.*. Esta sequência é a maior forma de tau verificada no SNC e codifica proteína tau que contém ambas as 2 inserções N-terminais de 29 aminoácidos cada e uma repetição extra de 31 aminoácidos no domínio de ligação à tubulina. A sequência de ADN e a sua

sequência de aminoácidos prevista são mostradas na Figura 21 (SEQ ID No: 4).

Foram utilizados plasmídeos recombinantes para transformar *E. coli* BL21 (DE3), uma estirpe utilizada para expressão procariótica que possui uma cópia cromossômica do gene da ARN-polimerase T7 de bacteriófago sob controlo do promotor lacUV5 (Studier e Moffat (1986), *J. Mol. Biol.* 189: 113-130). Foram induzidas culturas em crescimento exponencial com IPTG (isopropiltiogalactósido) durante 3 h.

A purificação em larga escala (1 litro de cultura bacteriana) de fragmentos de tau foi efectuada tal como descrito por Goeder e Jakes (1990, *EMBO J.* 9: 4225-4230), com pequenas modificações. As células foram destruídas através de congelação rápida do sedimento celular em azoto líquido. Os sedimentos foram então suspensos em tampão contendo PIPES 50 mM, ditiotreitól 1 mM (DTT) (pH 6,8). As proteínas termoestáveis no sobrenadante foram dialisadas contra PIPES/DTT, depois aplicadas a uma coluna contendo fosfocelulose equilibrada no mesmo tampão. A proteína tau foi eluída com um gradiente de NaCl (0-0,5 M) no tampão de cima. As fracções foram analisadas através de SDS-PAGE e tanto coloração de Coomassie como imunomarcacção. As fracções contendo tau foram reunidas, dialisadas contra MES 25 mM, DTT 1 mM (pH 6,25) e armazenadas a -20°C a aproximadamente 5 mg/ml. As concentrações proteicas foram medidas através do método de Lowry (Harrington (1990), *loc. cit.*).

Exemplo 3: Ligacção de MAP2C fetal a tau truncada e inteira

Uma explicacção possível para a falta de MAP2 em PHF pode ser que a MAP2 é incapaz de se ligar à unidade de tau central do PHF devido a diferenças de sequência nas regiões de repetições. Isto foi examinado experimentalmente utilizando o ensaio de ligacção padrão em duas configurações: tau truncada na fase sólida com MAP2C fetal na fase aquosa e MAP2C na fase sólida com tau inteira na fase aquosa. A ligacção pôde ser demonstrada em ambas as configurações, anti-tionina bloqueou a interacção de ligacção tau/MAP2. Assim, a agregacção na região de repetições em cadeia não é selectiva para tau e a actividade inibidora de inibidores de fenotiazina tais como

tionina não é dependente de sequências únicas de tau. A razão pela qual MAP2 não se verifica em PHF é no momento desconhecida, mas os factores podem incluir a contribuição do grande domínio N-terminal verificado na forma adulta de MAP2, diferenças nos compartimentos das células ou outras diferenças no processamento das moléculas de MAP2.

Exemplo 4: Transfecção das células 3T3 de ratinho com proteína tau humana

Foram transfectadas células fibroblastos 3T3 de ratinho com um vector de expressão eucariótica (pIF2) contendo as formas inteira e truncada da proteína tau sob controlo constitutivo de um promotor de β -globina. Este vector contém um gene de resistência à neomicina como marcador seleccionável (pSV2neo; Sambrook et al. (1989), *loc. cit.*; modificado por M.N. Neuberger). As células foram cultivadas em misturas essenciais mínimas definidas (MEMD) (DMEM) contendo agentes antimicrobianos e soro fetal de vitelo a 10% a 37°C numa atmosfera de CO₂ a 5%. Foram transfectadas com ADN plasmídico utilizando um protocolo padrão de fosfato de cálcio ou através de lipofectina (de acordo com o protocolo dos fabricantes; Gibco BRL). As células que integraram o ADN plasmídico foram seleccionadas através da viabilidade em meio contendo Geneticina (0,5 mg/ml; Southern e Berg (1982), *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 327).

Os fibroblastos 3T3 estavelmente transfectados que expressavam a proteína tau inteira foram prontamente produzidos. A expressão pôde ser demonstrada histologicamente utilizando anticorpos anti-tau genéricos (mAb 7.51) e específicos de humanos (mAb 499) (Figura 28) e através de imunotransferência de extractos celulares (não mostrado). Foram produzidas duas linhas celulares viáveis quando a transfecção foi efectuada utilizando o mesmo vector possuindo a unidade de tau central truncada. Pôde-se demonstrar histologicamente tau truncada dentro destas células, mas a morfologia destas células era grosseiramente anormal em comparação com as que expressavam tau inteira (Figura 29). As anomalias incluíam incapacidade do processo de desenvolvimento, formação de grandes células redondas, agregação citoplasmática de tau e vacuolação do citoplasma. No

entanto, provou-se que estas células eram instáveis e revertiam prontamente para formas incapazes de expressar a proteína tau truncada apesar da presença contínua de Geneticina. A toxicidade da tau truncada pode ser explicada através da acumulação de agregados tau-tau tóxicos na célula ou através da ligação de tau truncada a MAP endógenas de ratinho essenciais para a célula.

Exemplo 5: Crescimento de células transfectadas com tau na presença de inibidores de fenotiazina

A toxicidade da unidade de tau central truncada pode ser reversível em parte se os inibidores de fenotiazina protótipo puderem ser utilizados para bloquear a auto-agregação *in vivo*. Isto seria praticável apenas se os compostos não fossem intrinsecamente tóxicos às concentrações necessárias para bloquear a ligação tau-tau. Os inibidores com a toxicidade mais baixa em células 3T3 foram tionina e acriflavina e as células conseguiram sobreviver à exposição prolongada a estes compostos a concentrações substancialmente em excesso dos valores de K_i (100 nM) para a inibição da ligação tau-tau *in vitro*. Na prática, as células 3T3 puderam crescer durante vários meses na presença de tionina 2 μM .

A influência da tionina na interacção de ligação tau-tubulina foi examinada *in vivo* através da cultura de fibroblastos 3T3 transfectados com proteína tau inteira na presença de tionina numa variedade de concentrações. Foi observada destruição da distribuição citoesquelética normal da imunoreactividade de tau a concentrações na gama de 4-8 μM , comparáveis com a K_i conhecida para inibição da interacção de ligação tau-tubulina *in vitro* (8 μM), mas não se observaram efeitos ao longo da gama de concentração à qual as células 3T3 transfectadas eram rotineiramente cultivadas (0,5-2 μM). Estas constatações demonstram a praticabilidade de cultivar linhas celulares transfectadas na presença de um inibidor prototípico sem detrimento da viabilidade celular ou da distribuição citoesquelética normal de proteína tau inteira transgénica.

Verificou-se que o crescimento de células transfectadas na presença de inibidores da ligação tau-tau aumentava a viabilidade das células transfectadas com tau truncada de um

modo dependente da dose. O número de linhas celulares viáveis transfectadas com tau truncada aumentou quando as células cresceram na presença de concentrações mais elevadas de tionina. Para além disso, verificou-se que a força de expressão da tau truncada, medida através de imuno-histoquímica numa escala semi-quantitativa, aumentava em função da concentração de tionina utilizada após a transfecção.

A morfologia das células 3T3 e a distribuição da proteína tau truncada eram muito menos anormais quando as linhas celulares transfectadas eram produzidas na presença de tionina. A proteína tau truncada parecia seguir a distribuição da rede endógena de microtúbulos, mas a coloração de tau tinha um carácter mais quebrado que o observado com tau inteira. Verificou-se que as células que expressavam níveis elevados de tau truncada formavam agregados com destruição grosseira do citoplasma celular quando a tionina era removida. Isto foi semelhante às constatações iniciais para as células transfectadas na ausência de tionina.

Exemplo 6: Linhas celulares neuronais não transfectadas

Foram cultivadas linhas celulares neuronais (N2A, NIE-115) em DMEM contendo soro fetal de vitelo a 2% ou 10% e soro de cavalo a 5% em placas de cultura de tecidos revestidas com colagénio. Estas cresceram todas a 37°C numa atmosfera contendo CO₂ a 5%. Estudos imuno-histoquímicos iniciais de linhas celulares neuronais antes da transfecção conduziram à identificação de agregados citoplasmáticos imunorreactivos com mAb 423 que se formam no citoplasma de células de neuroblastoma não diferenciadas (células N2A) e em células PC-12 após um breve tratamento com dibutiril-AMPC (db-cAMP, que se sabe que diferencia células de neuroblastoma em cultura de tecidos). Mostrou-se que estas estruturas eram imunorreactivas com um anticorpo que reconhece uma proteína de neurofilamento (NFH; SMI-31, Sternberger *et al.*, (1985) *PNAS* 82: 4274-4276) e mais escassamente imunorreactivas com um anticorpo que reconhece MAP1A, que se sabe que se liga a neurofilamentos. No decurso da diferenciação, observou-se que esta imunorreactividade endógena a mAb 423 se deslocou do citoplasma para as neurites. A imunoprecipitação da

imunoreactividade a mAb 423 a partir destas células conduziu à identificação de uma espécie com mobilidade em gel de 230 kDa que foi reconhecida por SMI-31. Estes resultados sugerem que as estruturas reconhecidas por mAb 423 em linhas celulares neuronais de roedores incluem a proteína de neurofilamento de elevado peso molecular num estado agregado, mas não excluem a possibilidade de também incluírem MAP alteradas. Referimo-nos a estas como presumíveis agregados de NFH (pNFH). A inibição dependente da dose de agregados pNFH no citoplasma pôde ser demonstrada com tionina em células PC-12 não transfectadas.

Exemplo 7: Transfecção de linhas celulares neuronais com proteínas tau inteira e truncada e efeitos dos inibidores da agregação de tau

A. Células PC-12

Foram transfectadas células PC-12 com o vector pIF-2 contendo fragmento de tau central de PHF truncado em Glu-391 ou proteína tau inteira. Tal como com os fibroblastos 3T3, não foram produzidas linhas celulares viáveis transfectadas com tau truncada a menos que as células crescessem em tionina após a transfecção. Uma vez estabilizadas, as linhas celulares transfectadas foram analisadas na presença ou ausência de db-cAMP e na presença e ausência de tionina. Foram examinados dois pontos terminais: formação de agregados pNFH citoplasmáticos e distribuição da imunoreactividade de pNFH nas neurites.

Uma breve incubação com db-cAMP aumentou a proporção de células contendo agregados de neurofilamento de 9% para 37% ($p < 0,001$). Este efeito foi observado em células transfectadas com tau truncada (10% vs 47%, $p < 0,001$) e o efeito diferencial da tau truncada foi ele próprio significativo ($p = 0,005$). Assim, a transfecção com tau truncada acentuou a formação de agregados pNFH em resposta a db-cAMP.

O efeito da retirada de tionina após o tratamento com db-cAMP foi o de duplicar a frequência de células com agregados pNFH (27% vs 49%, $p = 0,05$). Estes aumentos foram observados para células transfectadas com tau inteira (16% vs 32%) e tau truncada (36% vs 60%). Um outro efeito foi a incorporação

dependente de tionina de imunoreactividade de pNFH nas neurites. Isto foi particularmente evidente em células PC-12 transfectadas com tau truncada, mas não com inteira ou células não transfectadas (índices de pNFH nas neurites de 0,49 vs 0,04 com e sem tionina respectivamente, $p=0,07$).

B. Células NIE-115

Em geral, os agregados pNFH observados no citoplasma de células N2A não ocorriam em células NIE não transfectadas. Pelo contrário, a imunoreactividade de pNFH era normalmente incorporada em neurites em crescimento durante o decurso da diferenciação, embora também tenha sido observado um estágio inicial de arco perinuclear. As células NIE foram transfectadas tal como acima com o vector pIF2 contendo proteína tau inteira ou truncada e crescendo na presença de tionina. Os efeitos da adição de db-cAMP na presença ou ausência de tionina foram então examinados.

Tal como com as células PC-12, não foram produzidas células NIE estáveis transfectadas com tau truncada na ausência de tionina. As transfectadas com tau truncada produziram uma frequência global de agregados pNFH no citoplasma significativamente maior que as células transfectadas com tau inteira (9% vs 26%, $p<0,001$) e a incubação com db-cAMP induziu agregados pNFH em células transfectadas com tau truncada mas não em transfectantes de tau inteira (6% vs 36%, $p<0,001$).

Em células transfectadas com tau inteira, a presença de tionina não interferiu com a incorporação de proteína tau transgénica no citoesqueleto microtubular, incluindo o centro organizador dos microtúbulos, a distribuição citoplasmática difusa e a extensão às neurites. A retirada da tionina em células transfectadas com tau inteira aumentou a proporção contendo agregados pNFH (7% vs 16%, $p=0,03$). Em células transfectadas com tau truncada a retirada da tionina resultou em maiores agregados pNFH em linhas celulares específicas (p. ex. NIE-ND6, 14% vs 44%, $p=0,07$), que se caracterizavam também por supressão da diferenciação. Esta revisão para um fenótipo anteriormente observado apenas em células N2A não diferenciadas, mas não em células NIE foi notável.

Tal como com as células PC-12, a incorporação dependente de tionina de pNFH em neurites pôde ser demonstrada após tratamento com db-cAMP em determinadas células (p. ex., NIE-ND1, índices de pNFH em neurites 0,1 vs 0,66 com e sem tionina, respectivamente, $p=0,01$). O transporte dependente de tionina de pNFH para as neurites pôde ser observado quantitativamente como o reverso da relação entre a imunoreactividade de NFH de neurofilamentos citoplasmáticos e neuríticos em células transfectadas na presença de tionina ($r = -0,52$ vs $r = +0,52$ sem e com tionina; $p = 0,01$ e $0,02$, respectivamente).

LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL

(i) REQUERENTE:

- (A) NOME: HOFFMANN-LA ROCHE AG
- (B) RUA: Grenzacherstrasse 124
- (C) CIDADE: Basle
- (D) ESTADO: BS
- (E) PAÍS: Suíça
- (F) CÓDIGO POSTAL: CH-4070
- (G) TELEFONE: 061-688 51 08
- (H) TELEFAX: 061-688 13 95
- (I) TELEX: 962292/965542 hlr ch

(ii) TÍTULO DO INVENTO: INIBIÇÃO DA ASSOCIAÇÃO TAU-TAU

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 12

(iv) FORMATO LEGÍVEL EM COMPUTADOR:

- (A) TIPO DE MEIO: Disquete
- (B) COMPUTADOR: compatível com IBM PC
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SUPORTE LÓGICO: PatentIn Release #1.0, Versão #1.30 (EPO)

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 109 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADEIA:
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 1:

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Leu | Lys | Asn | Val | Lys | Ser | Lys | Ile | Gly | Ser | Thr | Glu | Asn | Leu | Lys |
| 1 | | | 5 | | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| His | Gln | Pro | Gly | Gly | Gly | Lys | Val | Gln | Ile | Val | Tyr | Lys | Pro | Val | Asp |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Leu | Ser | Lys | Val | Thr | Ser | Lys | Cys | Gly | Ser | Leu | Gly | Asn | Ile | His | His |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Lys | Pro | Gly | Gly | Gly | Gln | Val | Glu | Val | Lys | Ser | Glu | Lys | Leu | Asp | Phe |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Lys | Asp | Arg | Val | Gln | Ser | Lys | Ile | Gly | Ser | Leu | Asp | Asn | Ile | Thr | His |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Val | Pro | Gly | Gly | Gly | Asn | Lys | Lys | Ile | Glu | Thr | His | Lys | Leu | Thr | Phe |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Arg | Glu | Asn | Ala | Lys | Ala | Lys | Thr | Asp | His | Gly | Ala | Glu | | | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | | | |

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 108 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADEIA:
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 2:

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Leu | Lys | Asn | Val | Lys | Ser | Lys | Ile | Gly | Ser | Thr | Glu | Asn | Leu | Lys |
| 1 | | | 5 | | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| His | Gln | Pro | Gly | Gly | Gly | Lys | Val | Gln | Ile | Ile | Asn | Lys | Lys | Leu | Asp |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Leu | Ser | Asn | Val | Gln | Ser | Lys | Cys | Gly | Ser | Lys | Asp | Asn | Ile | Lys | His |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Val | Pro | Gly | Gly | Gly | Ser | Val | Gln | Ile | Val | Tyr | Lys | Pro | Val | Asp | Leu |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Ser | Lys | Val | Thr | Ser | Lys | Cys | Gly | Ser | Leu | Gly | Asn | Ile | His | His | Lys |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Pro | Gly | Gly | Gly | Gln | Val | Glu | Val | Lys | Ser | Glu | Lys | Leu | Asp | Phe | Lys |
| | | | | 85 | | | | 90 | | | | | | 95 | |
| Asp | Arg | Val | Gln | Ser | Lys | Ile | Gly | Ser | Leu | Asp | Asn | | | | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | | | |

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 (A) COMPRIMENTO: 109 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) CADEIA:
 (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 3:

Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys
 1 5 10 15

His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp
 20 25 30

Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His
 35 40 45

Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe
 50 55 60

Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His
 65 70 75 80

Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe
 85 90 95

Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu
 100 105

~

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 (A) COMPRIMENTO: 1326 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) CADEIA: simples
 (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(ix) CARACTERÍSTICA PRINCIPAL:

- (A) NOME/CHAVE: CDS
 (B) LOCALIZAÇÃO: 1..1326

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 4:

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ATG | GCT | GAG | CCC | CGC | CAG | GAG | TTC | GAA | GTG | ATG | GAA | GAT | CAC | GCT | GGG | 48 |
| Met | Ala | Glu | Pro | Arg | Gln | Glu | Phe | Glu | Val | Met | Glu | Asp | His | Ala | Gly | , |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| ACG | TAC | GGG | TTG | GGG | GAC | AGG | AAA | GAT | CAG | GGG | GGC | TAC | ACC | ATG | CAC | 96 |
| Thr | Tyr | Gly | Leu | Gly | Asp | Arg | Lys | Asp | Gln | Gly | Gly | Tyr | Thr | Met | His | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| CAA | GAC | CAA | GAG | GGT | GAC | ACG | GAC | GCT | GGC | CTG | AAA | GAA | TCT | CCC | CTG | 144 |
| Gln | Asp | Gln | Glu | Gly | Asp | Thr | Asp | Ala | Gly | Leu | Lys | Glu | Ser | Pro | Leu | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| CAG | ACC | CCC | ACT | GAG | GAC | GGA | TCT | GAG | GAA | CCG | GGC | TCT | GAA | ACC | TCT | 192 |
| Gln | Thr | Pro | Thr | Glu | Asp | Gly | Ser | Glu | Glu | Pro | Gly | Ser | Glu | Thr | Ser | |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| GAT | GCT | AAG | AGC | ACT | CCA | ACA | GCG | GAA | GAT | GTG | ACA | GCA | CCC | TTA | GTG | 240 |
| Asp | Ala | Lys | Ser | Thr | Pro | Thr | Ala | Glu | Asp | Val | Thr | Ala | Pro | Leu | Val | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |
| GAT | GAG | GGA | GCT | CCC | GGC | AAG | CAG | GCT | GCC | GCG | CAG | CCC | CAC | ACG | GAG | 288 |
| Asp | Glu | Gly | Ala | Pro | Gly | Lys | Gln | Ala | Ala | Ala | Gln | Pro | His | Thr | Glu | |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | |
| ATC | CCA | GAA | GGA | ACC | ACA | GCT | GAA | GAA | GCA | GGC | ATT | GGA | GAC | ACC | CCC | 336 |
| Ile | Pro | Glu | Gly | Thr | Thr | Ala | Glu | Glu | Ala | Gly | Ile | Gly | Asp | Thr | Pro | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | | 110 | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| AGC | CTG | GAA | GAC | GAA | GCT | GCT | GGT | CAC | GTG | ACC | CAA | GCT | CGC | ATG | GTC | 384 |
| Ser | Leu | Glu | Asp | Glu | Ala | Ala | Gly | His | Val | Thr | Gln | Ala | Arg | Met | Val | |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | |
| AGT | AAA | AGC | AAA | GAC | GGG | ACT | GGA | AGC | GAT | GAC | AAA | AAA | GCC | AAG | GGG | 432 |
| Ser | Lys | Ser | Lys | Asp | Gly | Thr | Gly | Ser | Asp | Asp | Lys | Lys | Ala | Lys | Gly | |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | |
| GCT | GAT | GGT | AAA | ACG | AAG | ATC | GCC | ACA | CCG | CGG | GGA | GCA | GCC | CCT | CCA | 480 |
| Ala | Asp | Gly | Lys | Thr | Lys | Ile | Ala | Thr | Pro | Arg | Gly | Ala | Ala | Pro | Pro | |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | |
| GGC | CAG | AAG | GGC | CAG | GCC | AAC | GCC | ACC | AGG | ATT | CCA | GCA | AAA | ACC | CCG | 528 |
| Gly | Gln | Lys | Gly | Gln | Ala | Asn | Ala | Thr | Arg | Ile | Pro | Ala | Lys | Thr | Pro | |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | |
| CCC | GCT | CCA | AAG | ACA | CCA | CCC | AGC | TCT | GGT | GAA | CCT | CCA | AAA | TCA | GGG | 576 |
| Pro | Ala | Pro | Lys | Thr | Pro | Pro | Ser | Gly | Glu | Pro | Pro | Pro | Lys | Ser | Gly | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | |
| GAT | CGC | AGC | GGC | TAC | AGC | AGC | CCC | GGC | TCC | CCA | GGC | ACT | CCC | GGC | AGC | 624 |
| Asp | Arg | Ser | Gly | Tyr | Ser | Ser | Pro | Gly | Ser | Pro | Gly | Thr | Pro | Gly | Ser | |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | |
| CGC | TCC | CGC | ACC | CCG | TCC | CTT | CCA | ACC | CCA | CCC | ACC | CGG | GAG | CCC | AAG | 672 |
| Arg | Ser | Arg | Thr | Pro | Ser | Leu | Pro | Thr | Pro | Pro | Thr | Arg | Glu | Pro | Lys | |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | |
| AAG | GTG | GCA | GTG | GTC | CGT | ACT | CCA | CCC | AAG | TCG | CTG | TCT | TCC | GCC | AAG | 720 |
| Lys | Val | Ala | Val | Val | Arg | Thr | Pro | Pro | Lys | Ser | Leu | Ser | Ser | Ala | Lys | |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | |
| AGC | CGC | CTG | CAG | ACA | GCC | CCC | GTG | CCC | ATG | CCA | GAC | CTG | AAG | AAT | GGC | 768 |
| Ser | Arg | Leu | Gln | Thr | Ala | Pro | Val | Pro | Met | Pro | Asp | Leu | Lys | Asn | Gly | |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | |
| AAG | TCC | AAG | ATC | GGC | TCC | ACT | GAG | AAC | CTG | AAG | CAC | CAG | CCG | GGA | GGC | 816 |
| Lys | Ser | Lys | Ile | Gly | Ser | Thr | Glu | Asn | Leu | Lys | His | Gln | Pro | Gly | Gly | |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | |
| GGG | AAG | GTG | CAG | ATA | ATT | AAT | AAG | AAG | CTG | GAT | CTT | AGC | AAC | GTC | CAG | 864 |
| Gly | Lys | Val | Gln | Ile | Ile | Asn | Lys | Lys | Leu | Asp | Leu | Ser | Asn | Val | Gln | |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | |
| TCC | AAG | TGT | GGC | TCA | AAG | GAT | AAT | ATC | AAA | CAG | GTC | CCG | GGA | GGC | GGC | 912 |
| Ser | Lys | Cys | Gly | Ser | Lys | Asp | Asn | Ile | Lys | Gln | Val | Pro | Gly | Gly | Gly | |
| | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | |
| AGT | GTG | CAA | ATA | GTC | TAC | AAA | CCA | GTT | GAC | CTG | AGC | AAG | GTG | ACC | TCC | 960 |
| Ser | Val | Gln | Ile | Val | Tyr | Lys | Pro | Val | Asp | Leu | Ser | Lys | Val | Thr | Ser | |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | |
| AAG | TGT | GGC | TCA | TTA | GGC | AAC | ATC | CAT | CAT | AAA | CCA | GGA | GGT | GGC | CAG | 1008 |
| Lys | Cys | Gly | Ser | Leu | Gly | Asn | Ile | His | His | Lys | Pro | Gly | Gly | Gly | Gln | |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | | |
| GTG | GAA | GTA | AAA | TCT | GAG | AAG | CTT | GAC | TTC | AAG | GAC | AGA | GTC | CAG | TCG | 1056 |
| Val | Glu | Val | Lys | Ser | Glu | Lys | Leu | Asp | Phe | Lys | Asp | Arg | Val | Gln | Ser | |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | | |

```

AAG ATT GGG TCC CTG GAC AAT ATC ACC CAC GTC CCT GGC GGA GGA AAT 1104
Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
      355                      360                      365

AAA AAG ATT GAA ACC CAC AAG CTG ACC GTC CGC GAG AAC GCC AAA GCC 1152
Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Val Arg Glu Asn Ala Lys Ala
      370                      375                      380

AAG ACA GAC CAC GGG GCG GAG ATC GTG TAC AAG TCG CCA GTG GTG TCT 1200
Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
      385                      390                      395                      400

GGG GAC ACG TCT CCA CGG CAT CTC AGC AAT GTC TCC TCC ACC GGC AGC 1248
Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
                        405                      410                      415

ATT GAC ATG GTA GAC TCG CCC CAG CTC GCC ACG CTA GCT GAC GAG GGG 1296
Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Gly
      420                      425                      430

TCT GCC TCC CTG GCC AAG CAG GGT TTG TGA                      1326
Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu *
      435                      440

```

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
- (A) COMPRIMENTO: 442 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 5:

```

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1                      5                      10                      15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
      20                      25                      30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
      35                      40                      45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
      50                      55                      60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
      65                      70                      75                      80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
      85                      90                      95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
      100                      105                      110

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
      115                      120                      125

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
      130                      135                      140

```

Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
 145 150 155 160
 Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
 165 170 175
 Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
 180 185 190
 Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 195 200 205
 Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 210 215 220
 Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Leu Ser Ser Ala Lys
 225 230 235 240
 Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Gly
 245 250 255
 Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
 260 265 270
 Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
 275 280 285
 Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys Gln Val Pro Gly Gly Gly
 290 295 300
 Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
 305 310 315 320
 Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
 325 330 335
 Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
 340 345 350
 Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 355 360 365
 Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Val Arg Glu Asn Ala Lys Ala
 370 375 380
 Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
 385 390 395 400
 Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
 405 410 415
 Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Gly
 420 425 430
 Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu *
 435 440

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
- (A) COMPRIMENTO: 291 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 6:

ATCAAACACG TCCCGGGAGG CGGCAGTGTG CAAATAGTCT ACAAACCAGT TGACCTGAGC 60
 AAGGTGACCT CCAAGTGTGG CTCATTAGGC AACATCCATA AACCAGGAGG TGGCCAGGTG 120
 GAAGTAAAAT CTGAGAAGCT TGACTTCAAG GACAGAGTCC AGTCGAAGAT TGGGTCCCTG 180
 GACAATATCA CCCACGTCCC TGGCGGAGGA AATAAAAAGA TTGAAACCCA CAAGCTGACC 240
 TTCCGCGAGA ACGCCAAAGC CAAGACAGAC CACGGGGCGG AGTGAGAATT C 291

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 48 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 7:

GCCCGGGCCC CATAGATCAA ACACGTCCCG GGAGGGGCA GTGTGCAA 48

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 47 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 8:

AGATTACAGA ATTCTCACTC CGCCCCGTGG TCTGTCTTGG CTTTGGC 47

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 140 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADEIA:
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 9:

Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys
 1 5 10 15
 His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp
 20 25 30
 Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His
 35 40 45
 Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu
 50 55 60
 Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys
 65 70 75 80
 Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys
 85 90 95
 Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val
 100 105 110
 Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg
 115 120 125
 Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu
 130 135 140

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 140 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADEIA:
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 10:

Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Asp Asn Ile Lys
 1 5 10 15
 Tyr Gln Pro Lys Gly Gly Gln Val Arg Ile Leu Asn Lys Lys Ile Asp
 20 25 30
 Phe Ser Lys Val Gln Ser Arg Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His
 35 40 45
 Ser Ala Gly Gly Gly Asn Val Gln Ile Val Thr Lys Lys Ile Asp Leu
 50 55 60
 Ser His Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Lys Asn Ile Arg His Arg
 65 70 75 80
 Pro Gly Gly Gly Arg Val Lys Ile Glu Ser Val Lys Leu Asp Phe Lys
 85 90 95
 Glu Lys Val Gln Ala Lys Val Gly Ser Leu Asp Asn Ala His His Val
 100 105 110
 Pro Gly Gly Gly Asn Val Lys Ile Asp Ser Gln Lys Leu Asn Phe Arg
 115 120 125
 Glu His Ala Lys Ala Arg Val Asp His Gly Ala Glu
 130 135 140

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 11:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 34 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 11:

CGCGACGCGT ATGATCAAAC ACGTCCCGGG AGGC 34

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 12:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 37 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADEIA: simples
 - (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

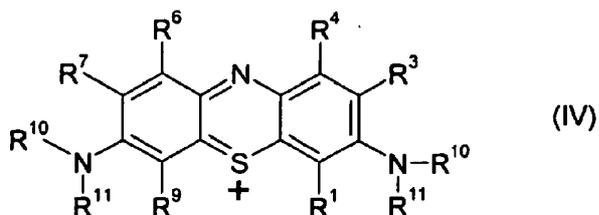
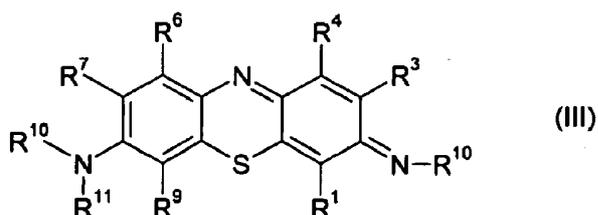
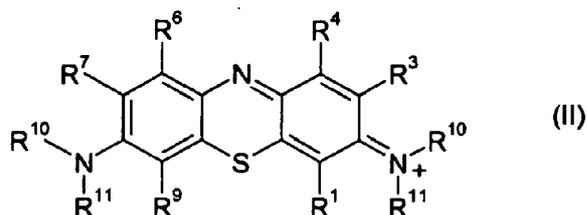
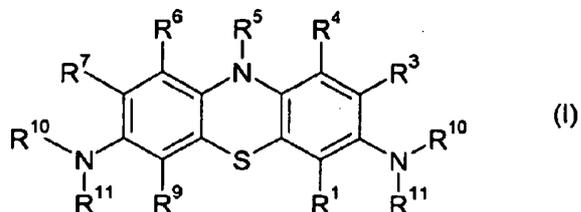
(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 12:

CGGCTTTGTC TGGTGCCCCG CCTCACTCCT AGGGCGC 37

Lisboa, 2010-08-25

REIVINDICAÇÕES

1. Fenotiazina de fórmula



em que:

R_1 , R_3 , R_4 , R_6 , R_7 e R_9 são independentemente seleccionados entre hidrogénio, halogéneo, hidroxí, carboxi, alquilo, haloalquilo ou alcoxi substituídos ou não substituídos;

R_5 , cada R_{10} e cada R_{11} são independentemente seleccionados entre hidrogénio, hidroxí, carboxi, alquilo, haloalquilo ou alcoxi substituídos ou não substituídos;

e seus sais farmacologicamente aceitáveis, para utilização na profilaxia ou tratamento de uma doença neurodegenerativa de

agregação patológica tau-tau por inibição da referida associação patológica tau-tau sem inibição da ligação normal tau-tubulina.

2. Fenotiazina de acordo com a reivindicação 1, em que a referida fenotiazina é seleccionada do grupo em que:

R₁, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₉, cada R₁₀ e cada R₁₁ são independentemente seleccionados entre hidrogénio, -CH₃, -C₂H₅ ou -C₃H₇.

3. Fenotiazina de acordo com a reivindicação 1 em que a referida fenotiazina tem a fórmula (i) anterior.

4. Fenotiazina de acordo com a reivindicação 3 em que R₅ é hidrogénio.

5. Fenotiazina de acordo com a reivindicação 1 em que o referido composto é seleccionado entre Azul de Metileno, Azul de Toluidina O, tionina, azul Azure A, azul Azure B ou 1,9-dimetil-Azul de Metileno.

6. Fenotiazina de acordo com a reivindicação 1 em que o agente está presente numa quantidade terapêuticamente eficaz num material transportador terapêuticamente inerte numa composição farmacêutica.

7. Azul de metileno para utilização no tratamento da Doença de Alzheimer.

Lisboa, 2010-08-25

RESUMO

"Inibição da associação tau-tau"

O presente invento refere-se a novos métodos para a detecção de substâncias capazes de modular ou inibir a associação proteica patológica tau-tau e a agregação patológica de neurofilamentos. Os métodos do presente invento são particularmente úteis na pesquisa de substâncias para a profilaxia e tratamento de doença de Alzheimer, doença de neurónios motores, doença do corpo de Lewy, doença de Pick e paralisia supranuclear progressiva. Em adição, são descritas substâncias capazes de inibir selectivamente agregados patológicos enquanto preservando a função citoesquelética normal.

Fig. 1

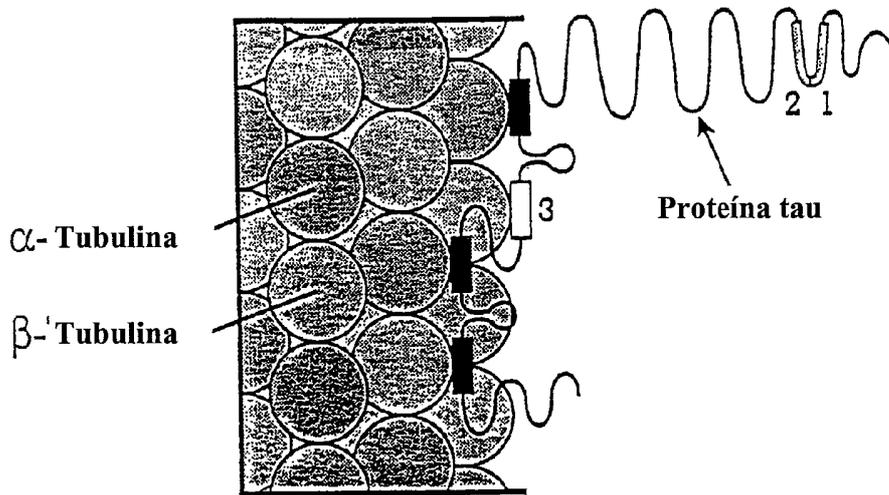


Fig. 2

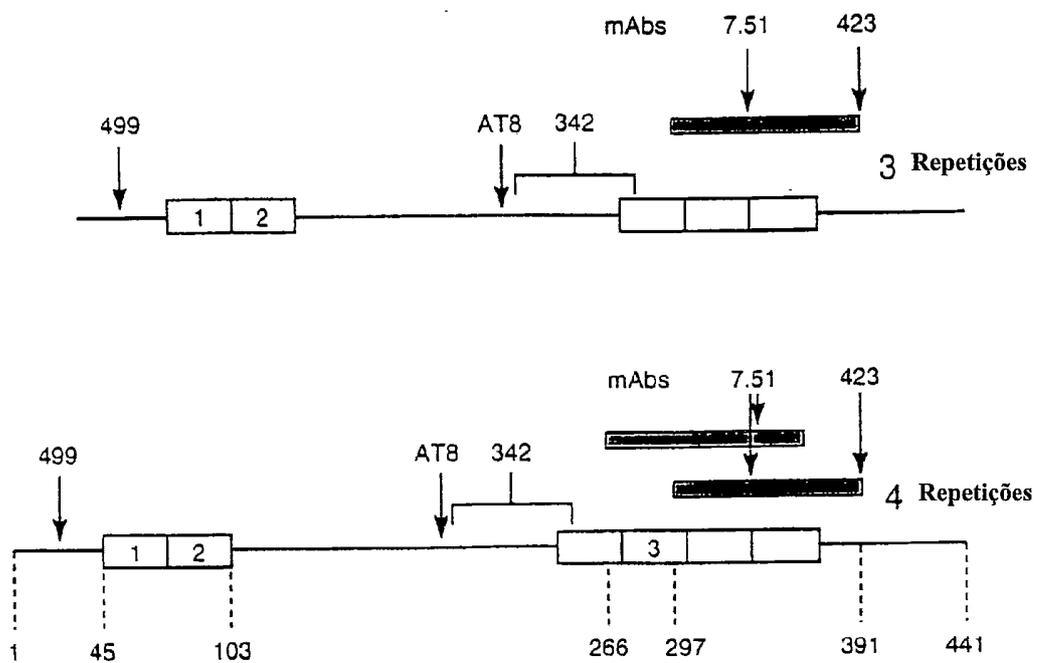


Fig. 3

A [R1,R3,R4]

D L K N V K S K I G S T E N
L K H O P G G G K V Q I V Y K P V D L S K V T S K C G S L G N
I H H K P G G G Q V E V K S E K L D F K D R V O S K I G S L D N
I T H V P G G G N K K I E T H K L t f r e n a k a k t d h g a e

(SEQ ID NO: 1)

B [R1,R2,R3]

D L K N V K S K I G S T E N
L K H O P G G G K V Q I I N K K L D L S N V O S K C G S K D N
I K H V P G G G S V Q I V Y K P V D L S K V T S K C G S L G N
I H H K P G G G Q V E V K S E K L D F K D R V O S K I G S L D N[?]

(SEQ ID NO: 2)

C [R2,R3,R4]

D L S N V O S K C G S K D N
I K H V P G G G S V Q I V Y K P V D L S K V T S K C G S L G N
I H H K P G G G Q V E V K S E K L D F K D R V O S K I G S L D N
I T H V P G G G N K K I E T H K L t f r e n a k a k t d h g a e

(SEQ ID NO: 3)

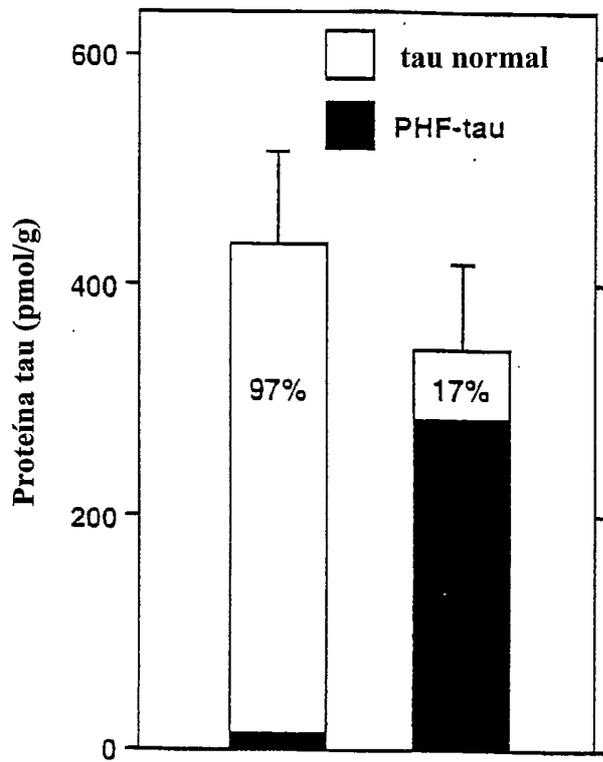


Fig. 4

Fig. 5

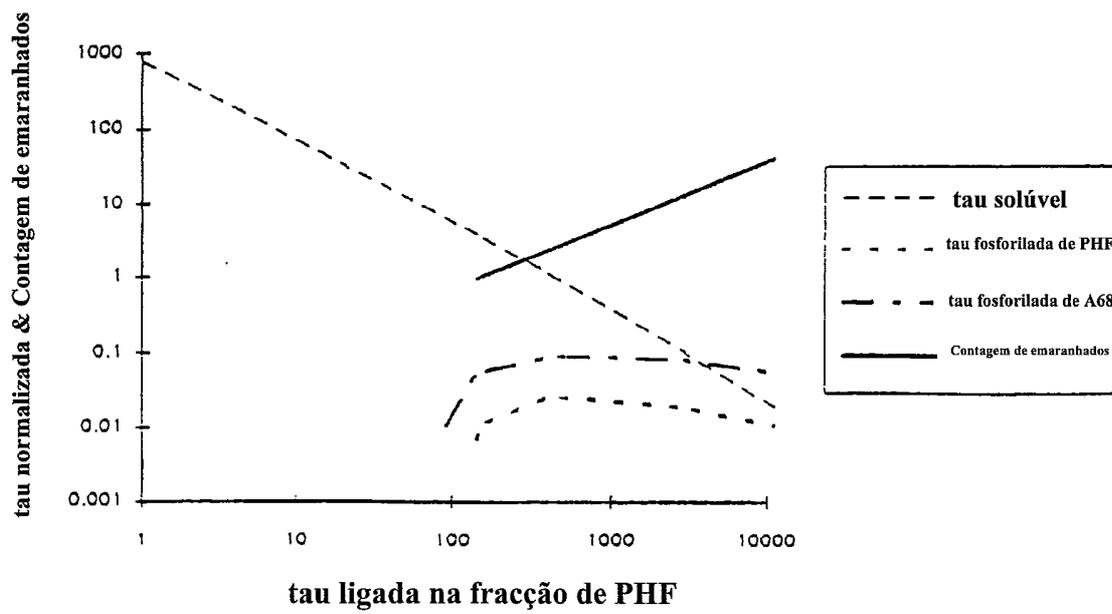


Fig. 6A

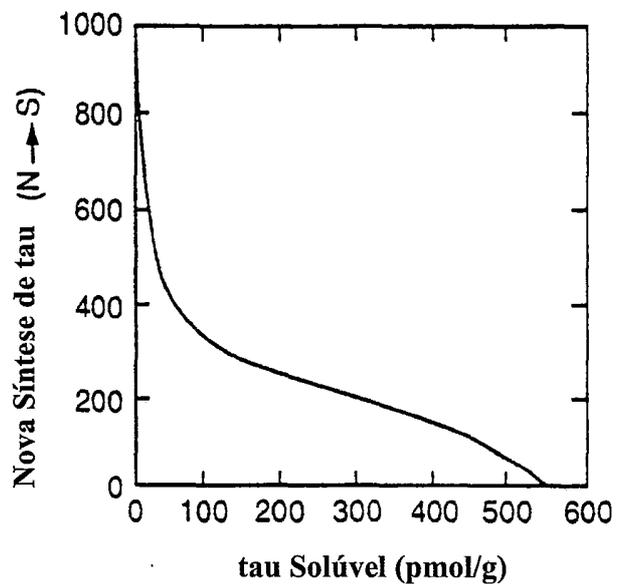


Fig. 6B

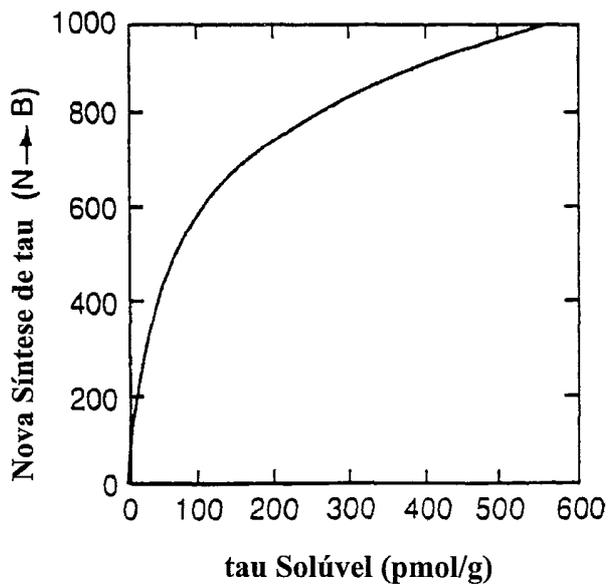


Fig. 7

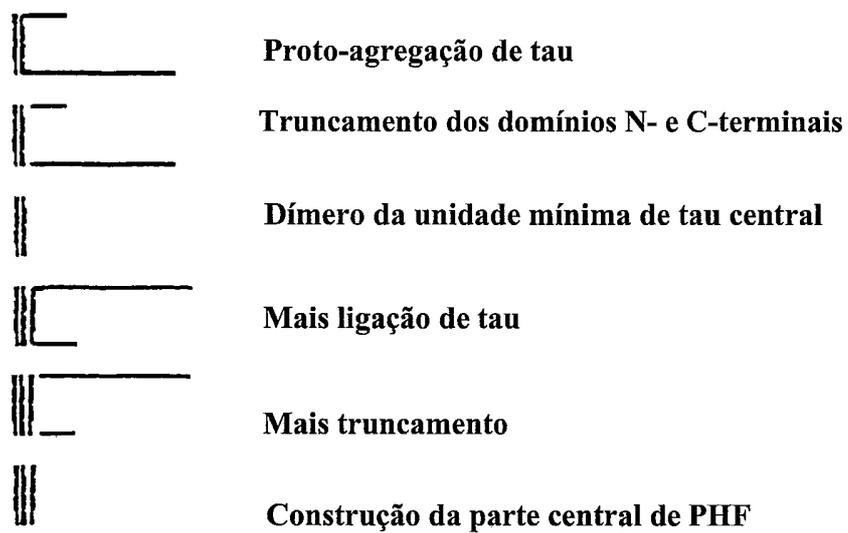


Fig. 8

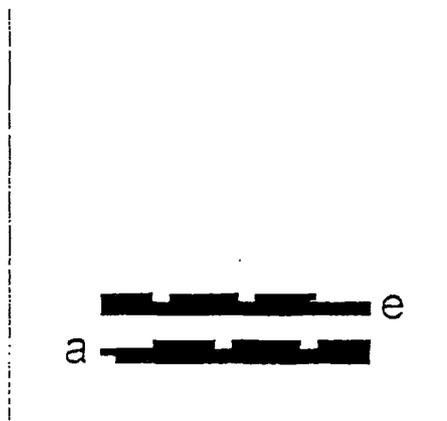


Fig. 9

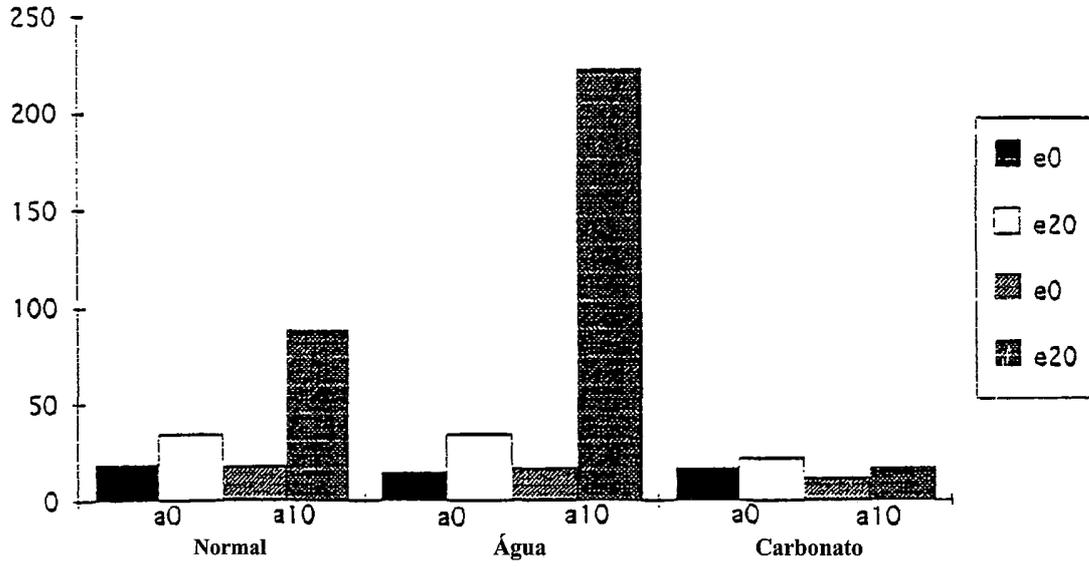


Fig. 10

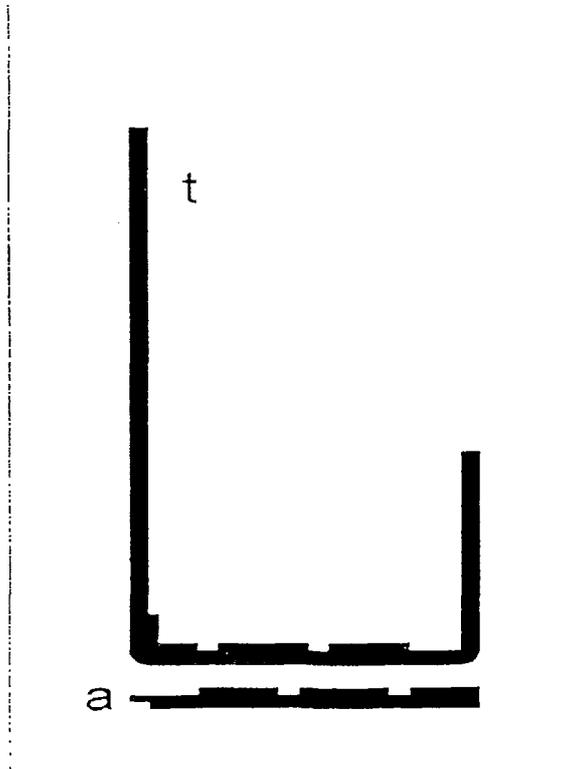


Fig. 11

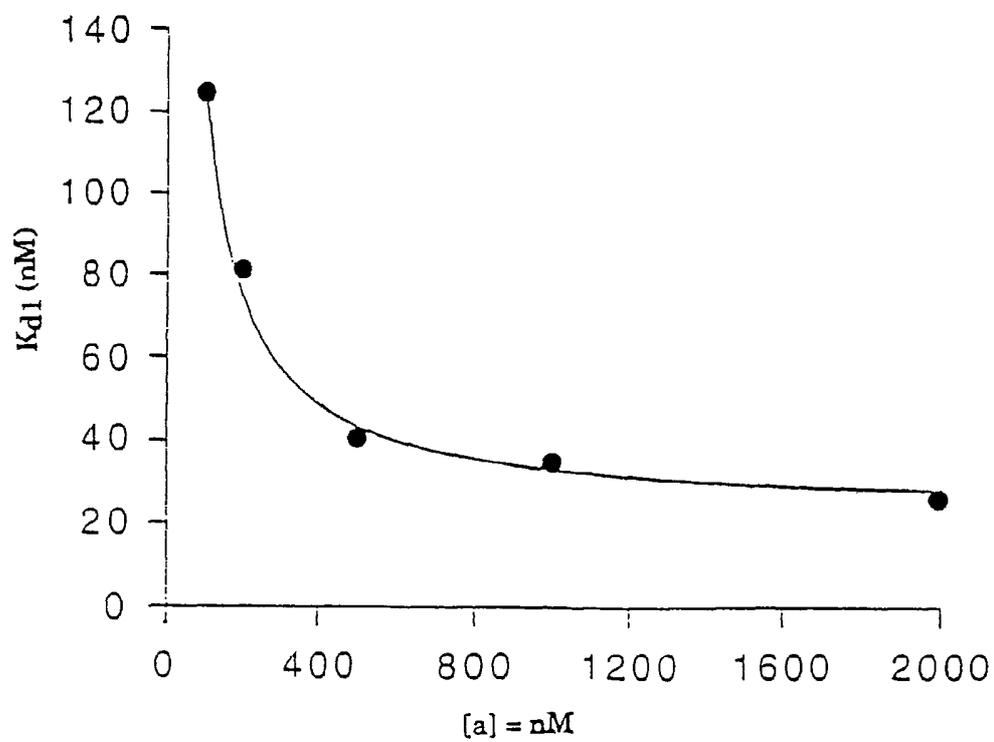
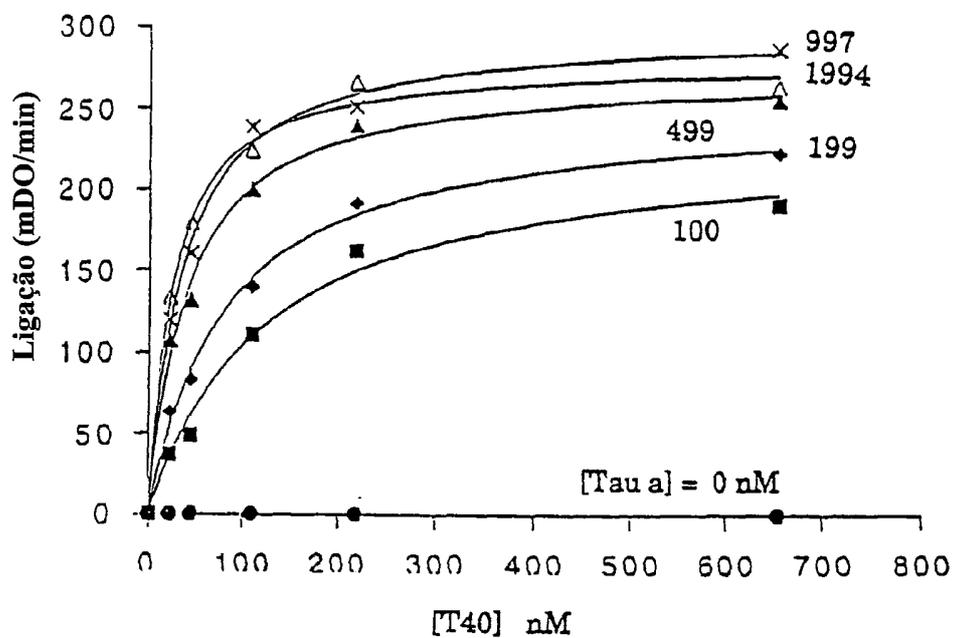


Fig. 12

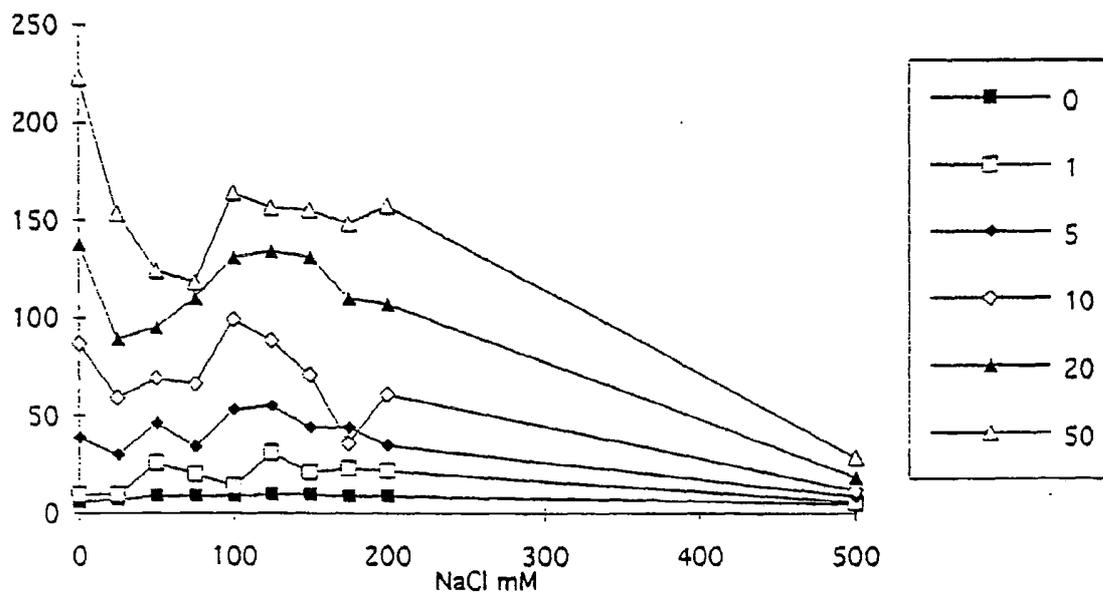


Fig. 13

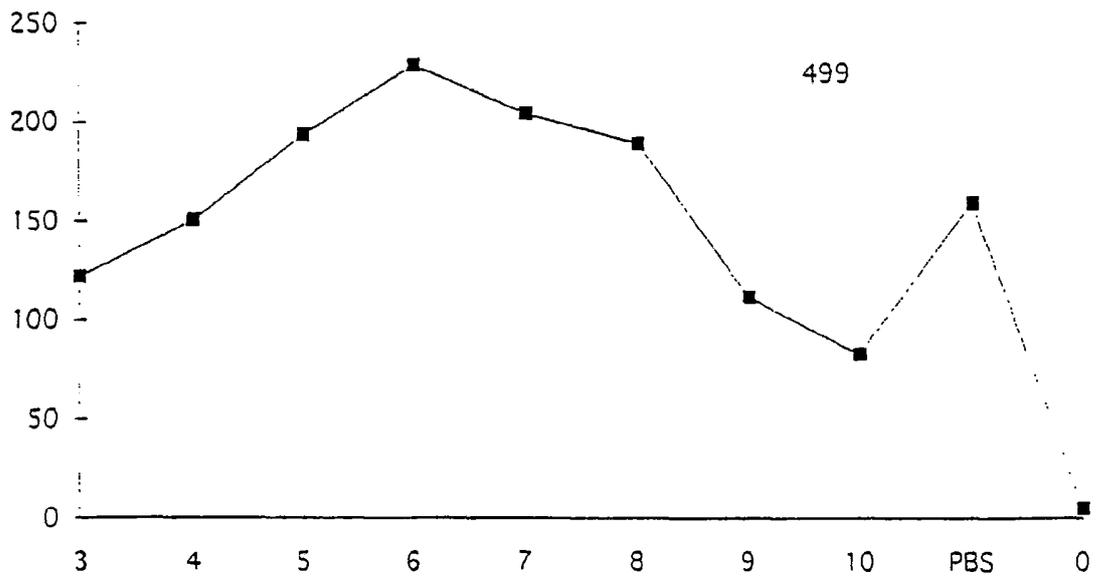
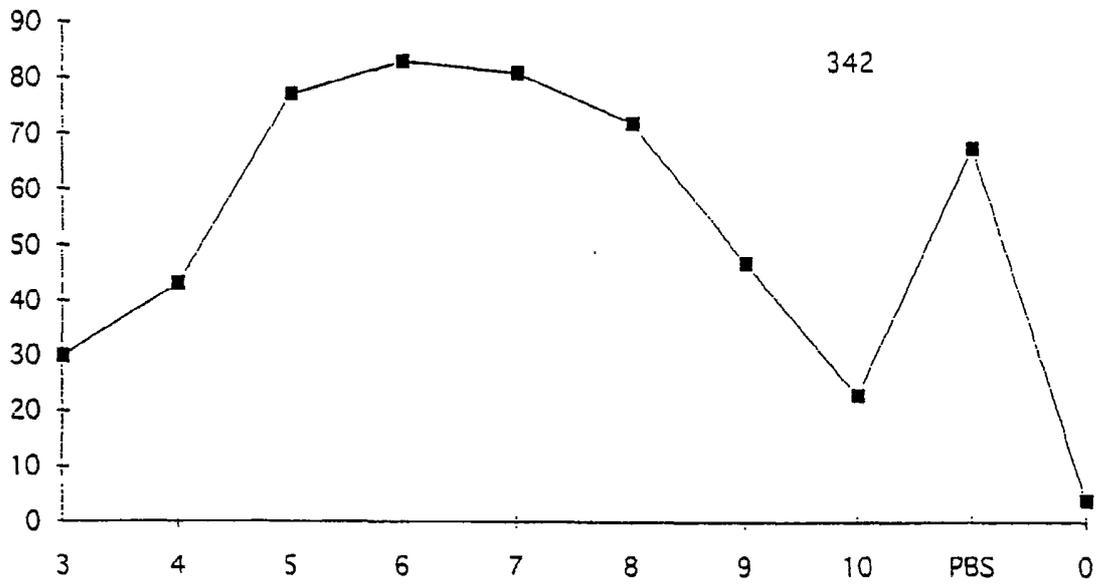


Fig. 14

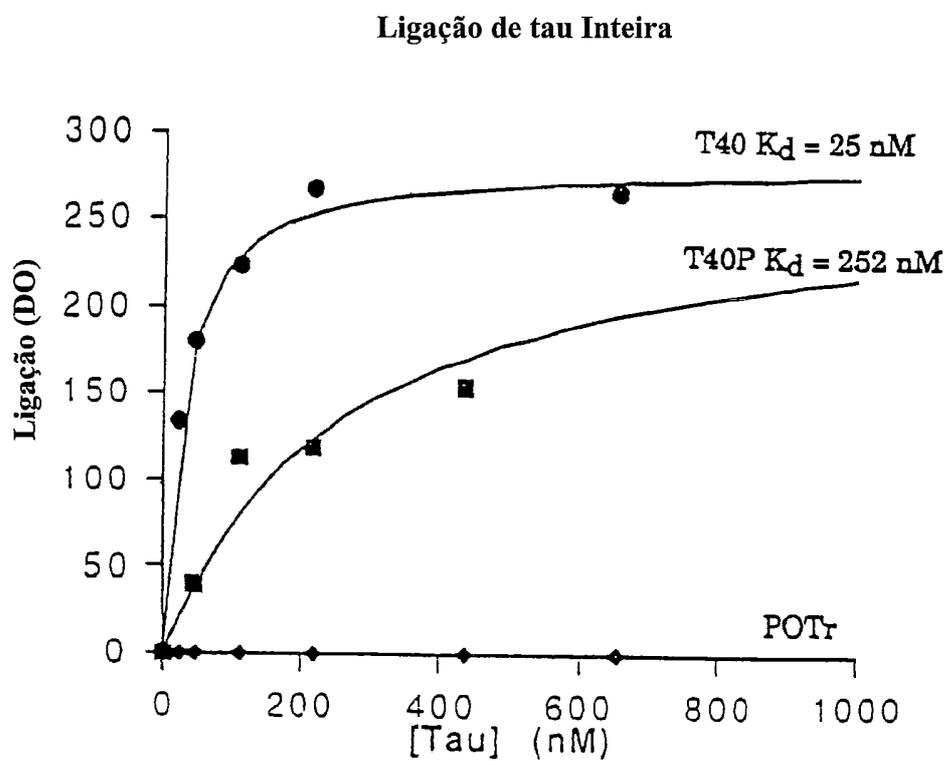


Fig. 15A

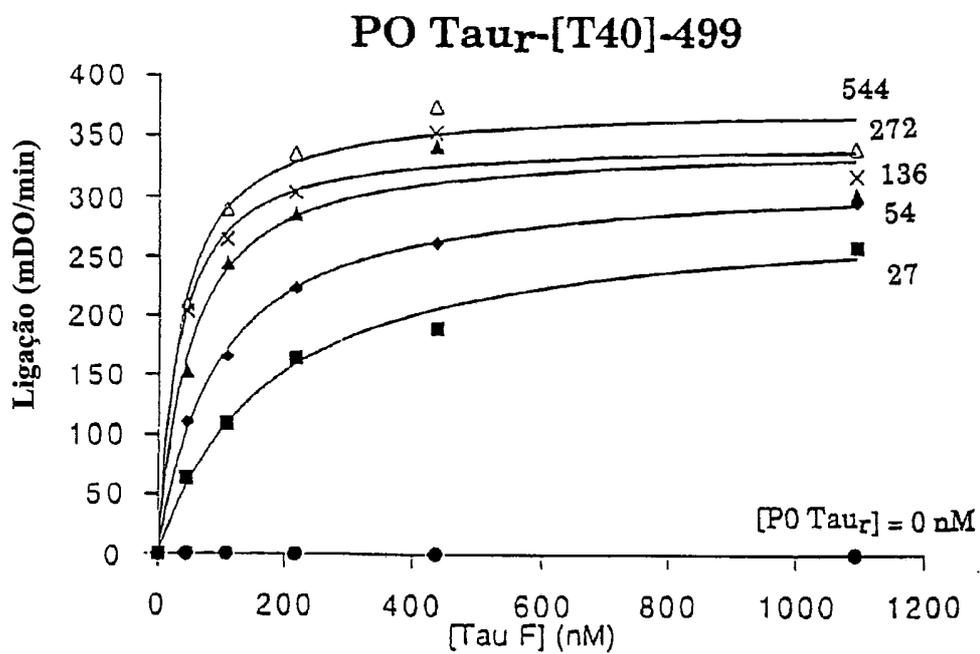
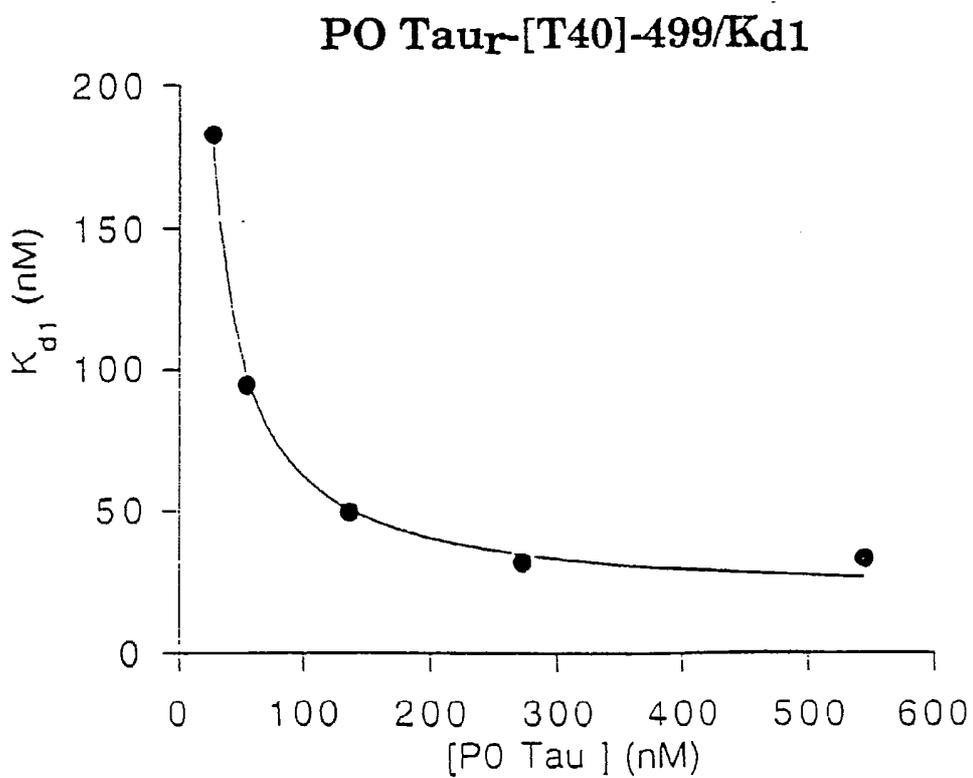


Fig. 15B



| Fase Sólida | Fase Aquosa | | Recém-nascido |
|-----------------|-------------|--------|---------------|
| | T40 | T40P | |
| dGA | 25 nM | 252 nM | Sem ligação |
| Recém-nascido | 19 nM | 627 nM | |
| Recém-nascido P | 754 nM | 969 nM | |

Fig. 16

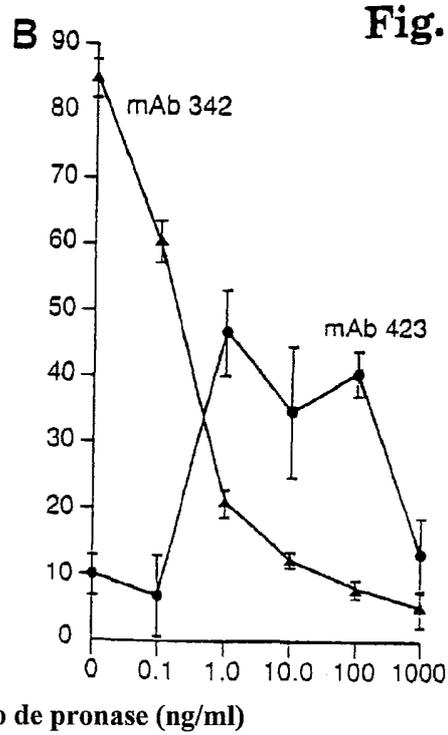
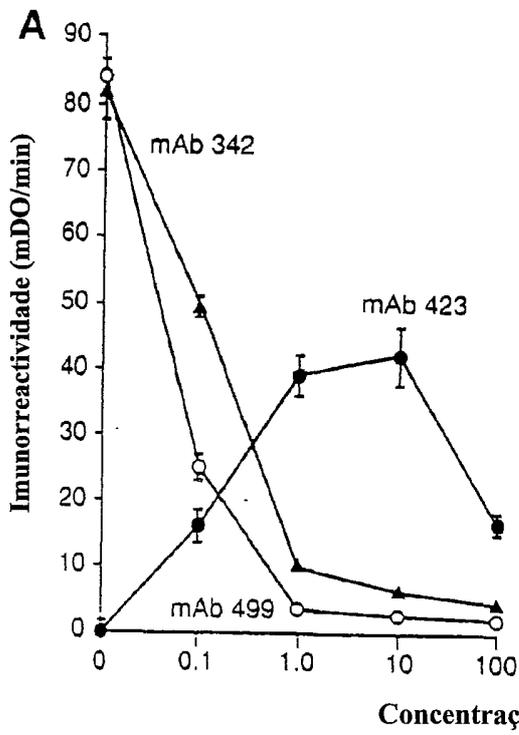
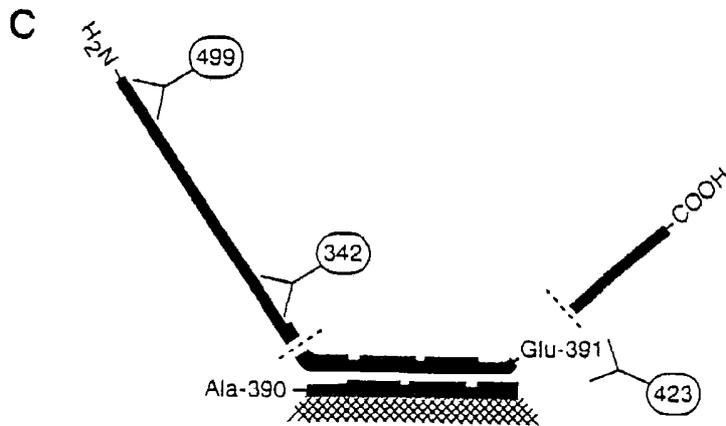


Fig. 17



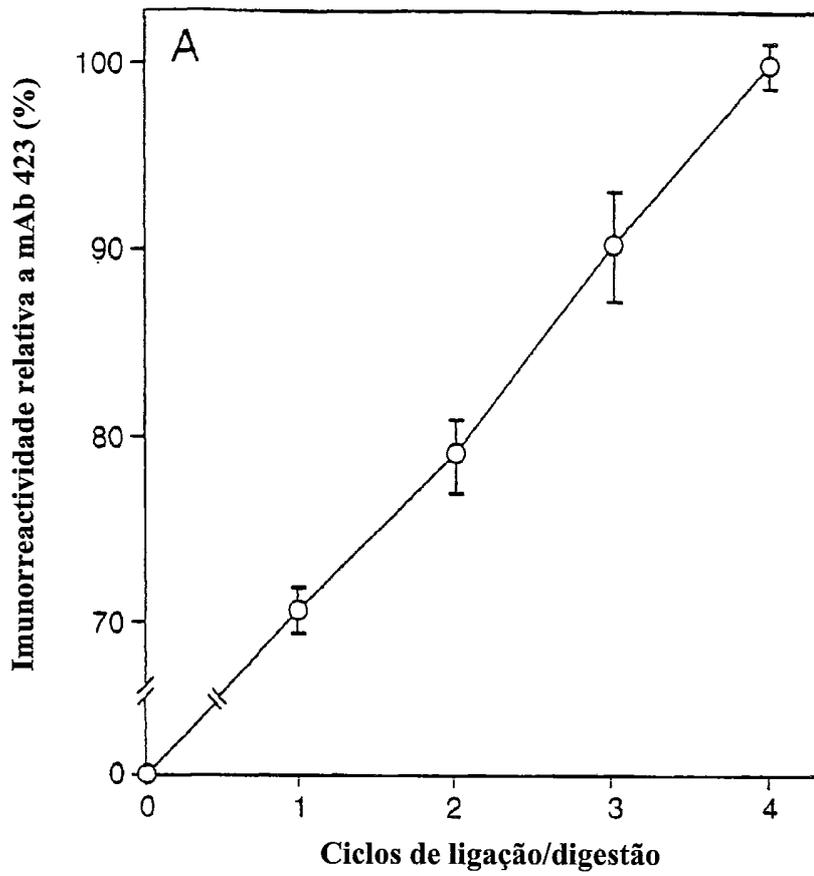
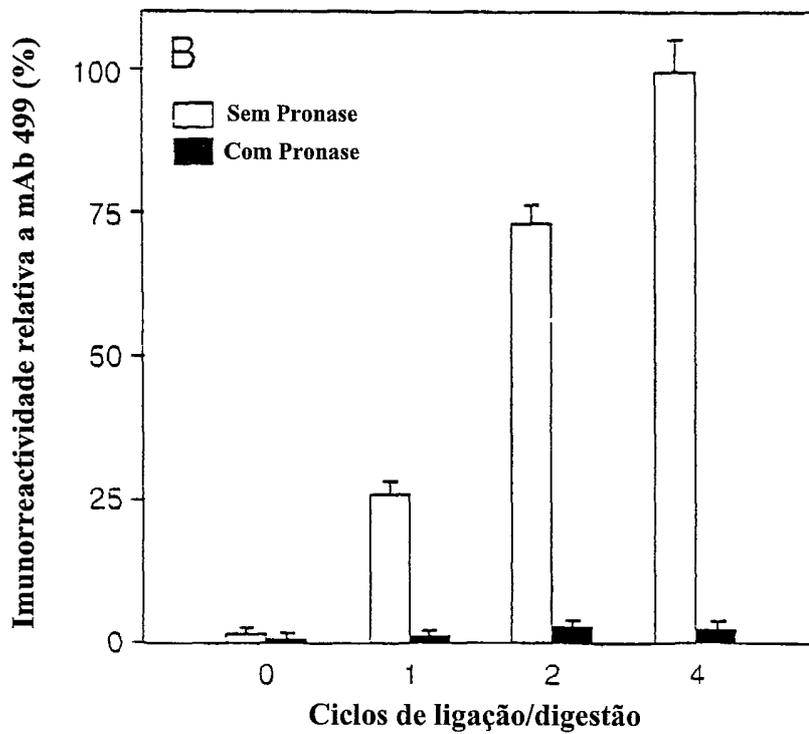


Fig. 18



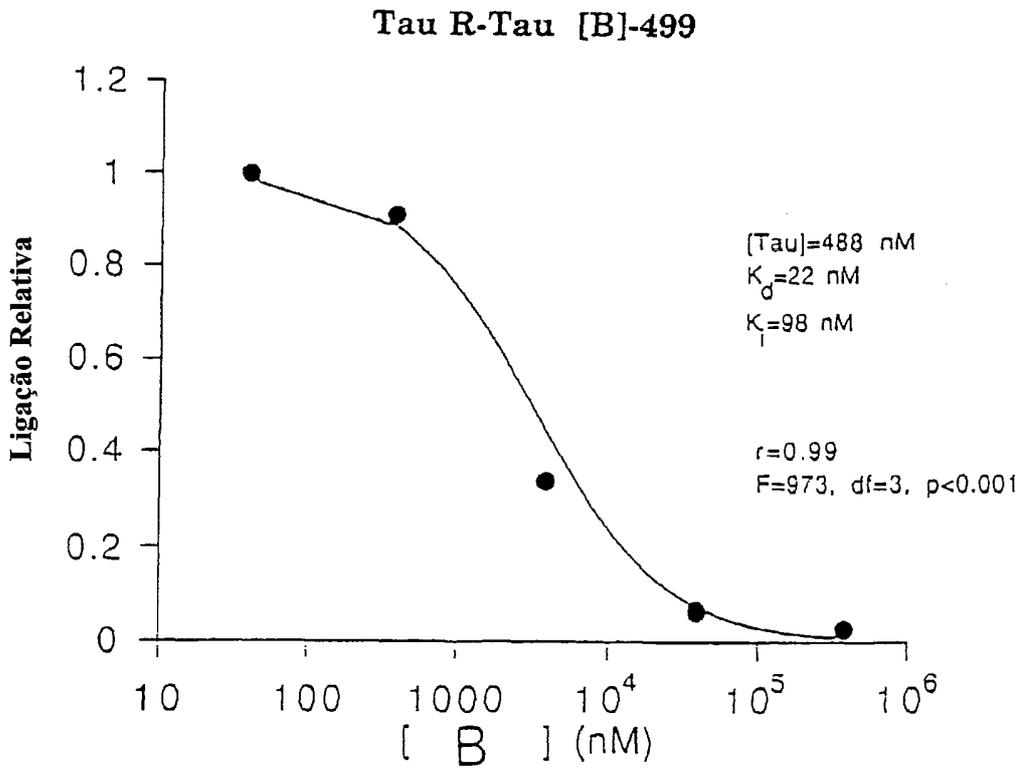
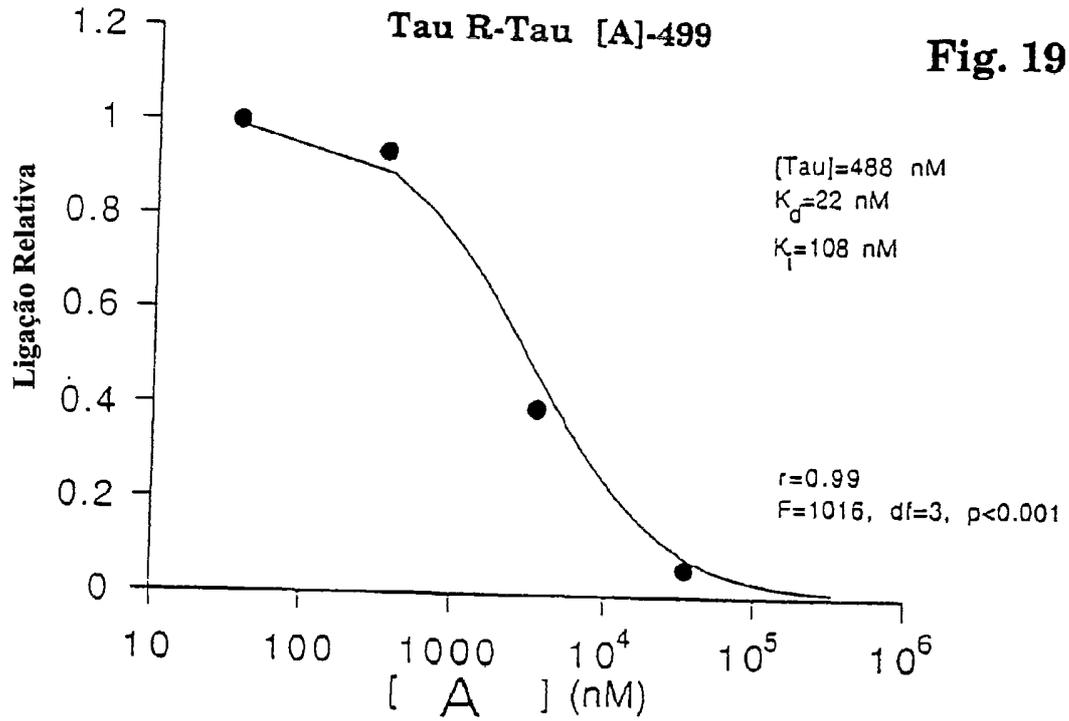


Fig. 20

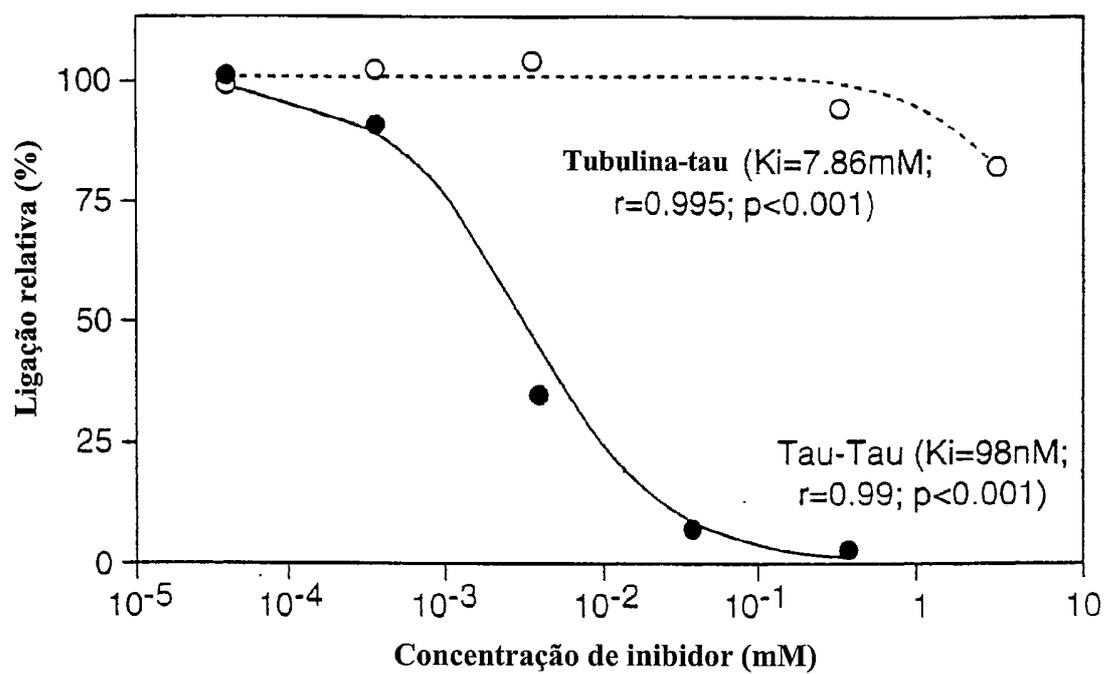


Fig. 21B

AAG GTG GCA GTG GTC CGT ACT CCA CCC AAG TCG CTG TCT TCC GCC AAG
 Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Leu Ser Ser Ala Lys
 225 230 235 240

AGC CGC CTG CAG ACA GCC CCC GTG CCC ATG CCA GAC CTG AAG AAT GGC
 Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Gly
 245 250 255

AAG TCC AAG ATC GGC TCC ACT GAG AAC CTG AAG CAC CAG CCG GGA GGC
 Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
 260 265 270

~~GGG AAG GTG CAG ATA ATT AAT AAG AAG CTG GAT CTT AGC AAC GTC CAG
 Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
 275 280 285~~

~~TCC AAG TGT GGC TCA AAG GAT AAT ATC AAA CAG GTC CCG GGA GGC GGC
 Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys Gln Val Pro Gly Gly Gly
 290 295 300~~

AGT GTG CAA ATA GTC TAC AAA CCA GTT GAC CTG AGC AAG GTG ACC TCC
~~Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
 305 310 315 320~~

AAG TGT GGC TCA TTA GGC AAC ATC CAT CAT AAA CCA GGA GGT GGC CAG
 Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
 325 330 335

GTG GAA GTA AAA TCT GAG AAG CTT GAC TTC AAG GAC AGA GTC CAG TCG
 Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
 340 345 350

AAG ATT GGG TCC CTG GAC AAT ATC ACC CAC GTC CCT GGC GGA GGA AAT
 Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 355 360 365

AAA AAG ATT GAA ACC CAC AAG CTG ACC GTC CGC GAG AAC GCC AAA GCC
 Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Val Arg Glu Asn Ala Lys Ala
 370 375 380

AAG ACA GAC CAC GGG GCG GAG ATC GTG TAC AAG TCG CCA GTG GTG TCT
 Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
 385 390 395 400

GGG GAC ACG TCT CCA CGG CAT CTC AGC AAT GTC TCC TCC ACC GGC AGC
 Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
 405 410 415

ATT GAC ATG GTA GAC TCG CCC CAG CTC GCC ACG CTA GCT GAC GAG GGG
 Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Gly
 420 425 430

TCT GCC TCC CTG GCC AAG CAG GGT TTG TGA
 Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu ***
 435 440

Fig.22

NdeI
 5' catag
 atcaaacacgtcccgggagggcggcagtggtgcaaatagtctacaaaccagttgacctgagcaag
 (M)
 IleLysHisValProGlyGlyGlySerValGlnIleValTyrLysProValAspLeuSerLys
 gtgacctccaagtgtggctcattaggcaacatccatcataaaccaggaggtggccaggtggaagtaaaatct
 ValThrSerLysCysGlySerLeuGlyAsnIleHisHisLysProGlyGlyGlyGlnValGluValLysSer
 gagaagcttgacttcaaggacagagtccagtcgaagattgggtccctggacaatatcaccacgtccctggc
 GluLysLeuAspPheLysAspArgValGlnSerLysIleGlySerLeuAspAsnIleThrHisValProGly
 ggaggaaataaaaagattgaaacccacaagctgacctccgcgagaacgccaagccaagacagaccaggg
 GlyGlyAsnLysLysIleGluThrHisLysLeuThrPheArgGluAsnAlaLysAlaLysThrAspHisGly
 gcggag tgagaattc...3'
 AlaGlu *** EcoRI
 (SEQ ID NO: 6)

Iniciadores utilizados para dGAE (Novak et al. 1993)

a) iniciador com sentido

NdeI
 5' ..gcccgggccccaragatcaaacacgtcccgggagggcggcagtggtgcaa..3'
 (SEQ ID NO: 7)

b) iniciador anti-sentido

EcoRI
 5' ..agattacagaarrtctcactccgccccgtgggtctgtcttggctttggc..3'
 (SEQ ID NO: 8)

Classificação de compostos pela inibição da interação tau-tau

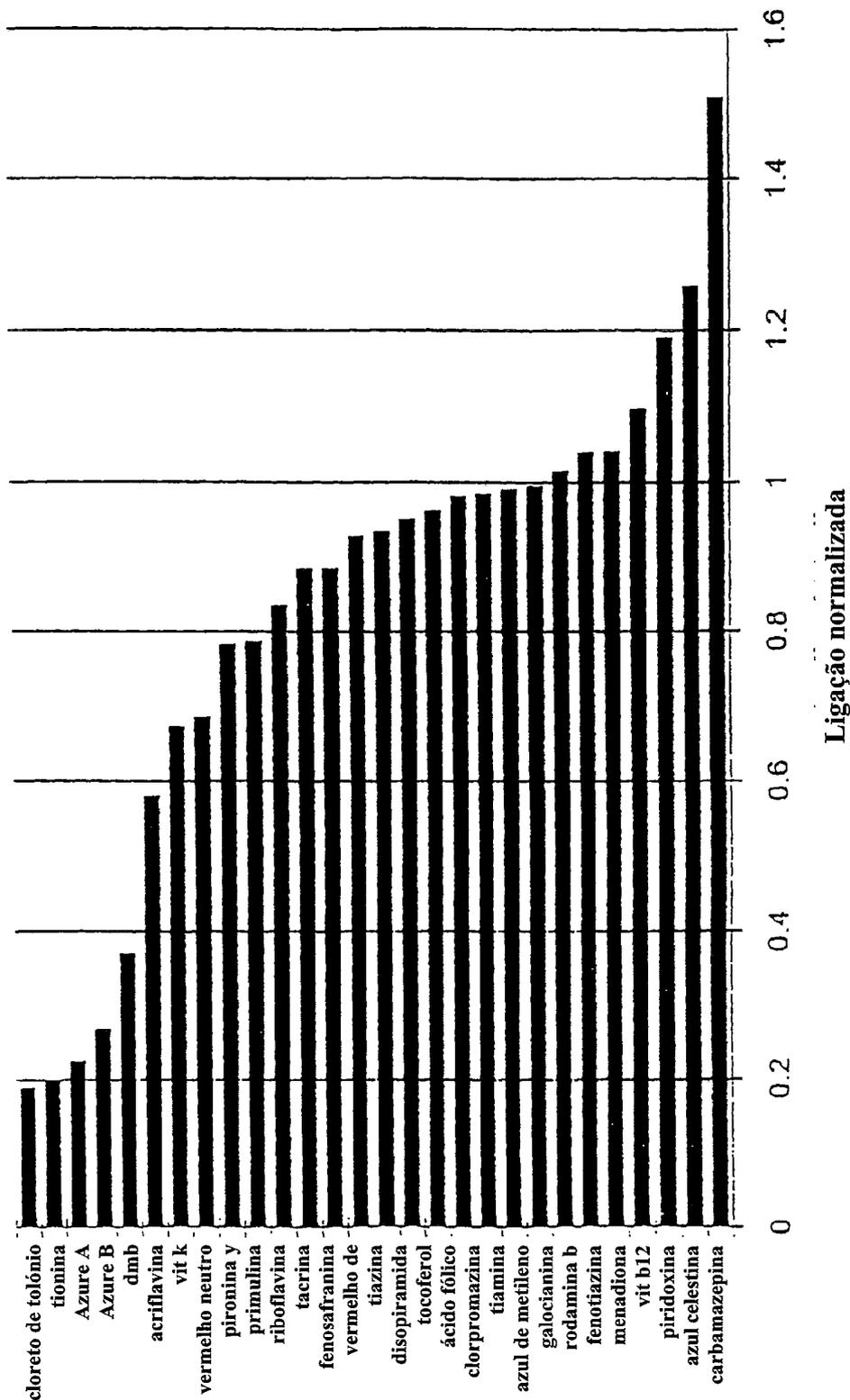
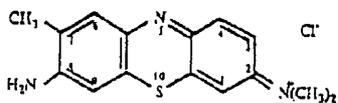
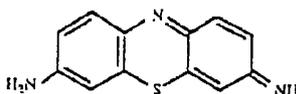


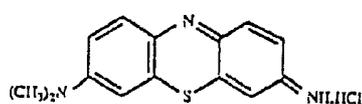
Fig. 23

Fig. 24A**Azul de Toluidina O**

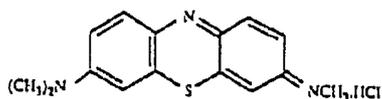
0.19

Tionina

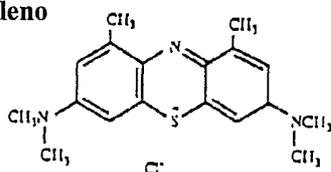
0.201

Azul Azure A

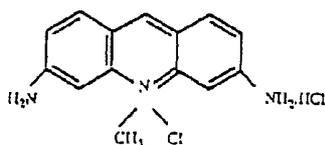
0.227

Azul Azure B

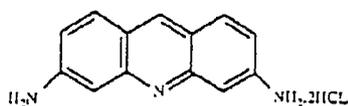
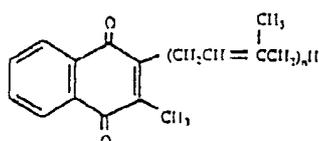
0.269

1,9-Dimetil-Azul de Metileno

0.372

Acriflavina HCL

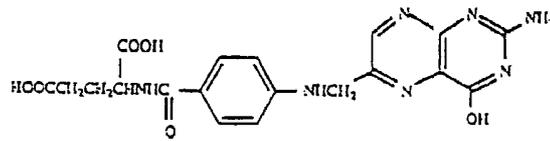
0.583

**Vitamina K₂**

0.674

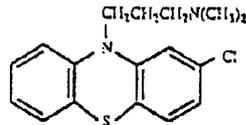
Fig. 24C

Ácido Fólico



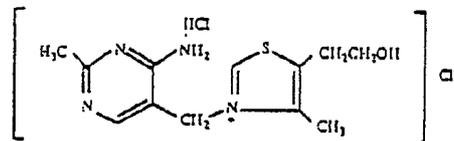
0.964

Clorpromazina



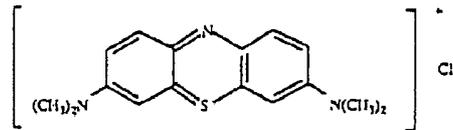
0.982

Tiamina HCL



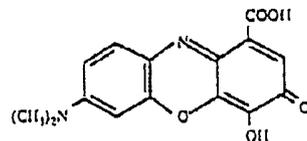
0.985

Azul de Metileno



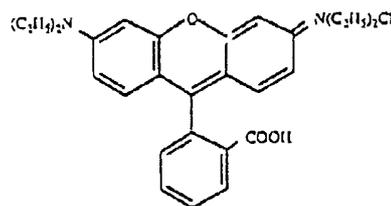
0.992

Galocianina



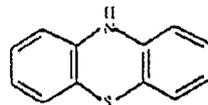
0.997

Rodamina B



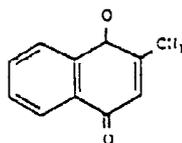
1.015

Fenotiazina



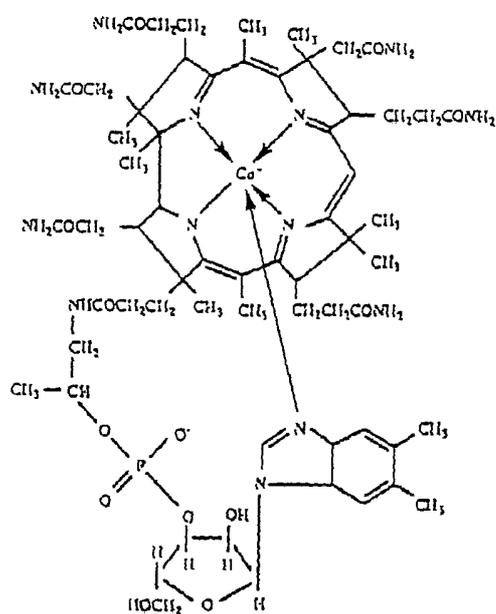
1.04

Menadiona



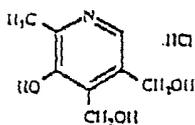
1.042

Fig. 24D

Vitamina B₁₂

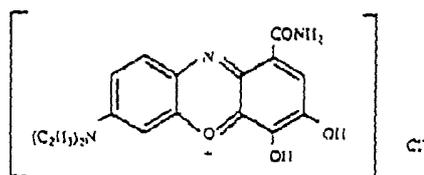
1.098

Cloridrato de Piridoxina



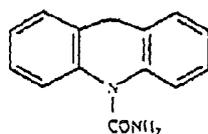
1.192

Azul Celestina



1.259

Carbamazepina



1.51

Fig. 25

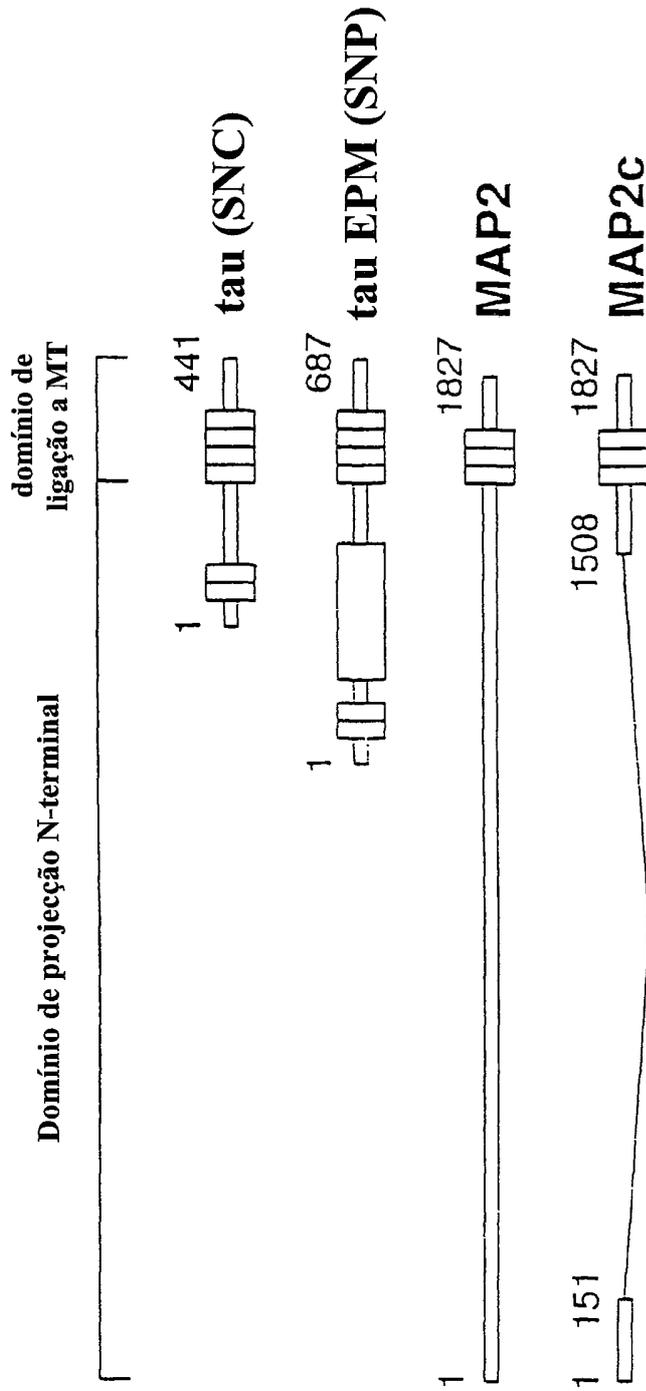


Fig. 28



Fig. 29

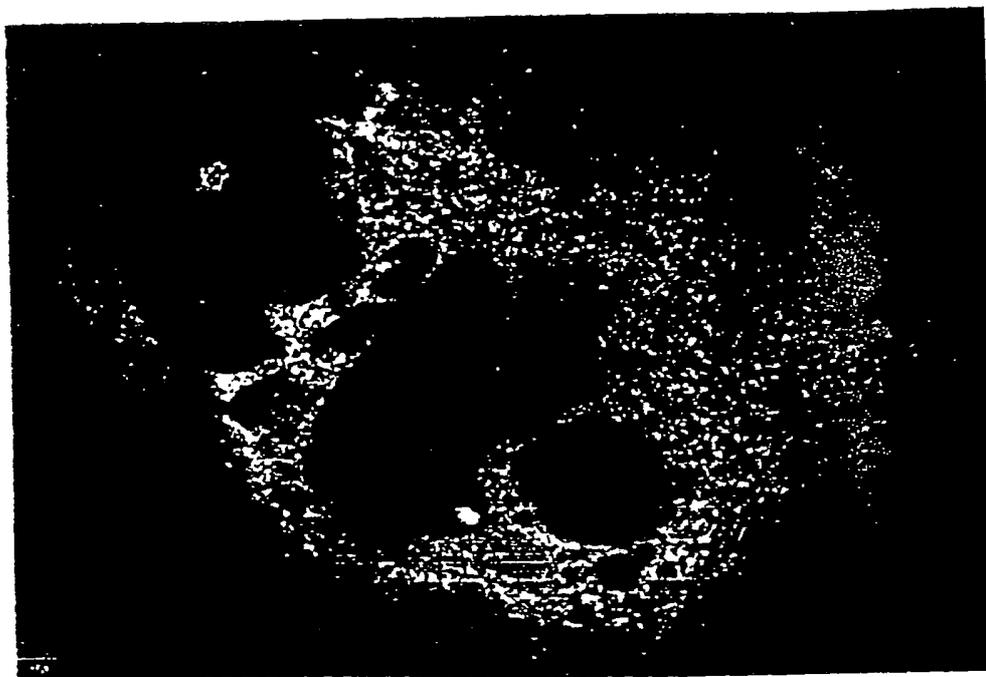
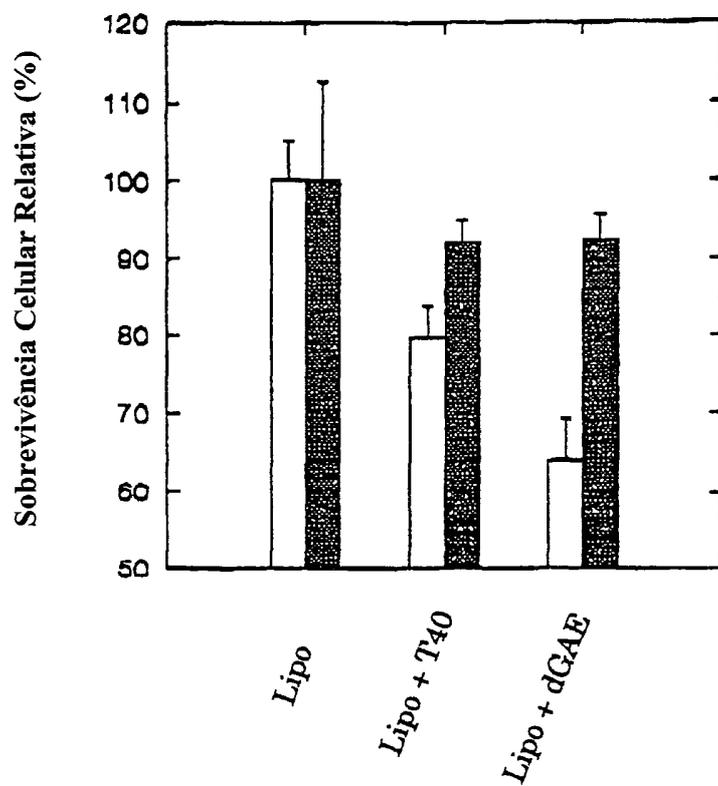


Fig. 30



Transferência de Lipofectina/Proteína

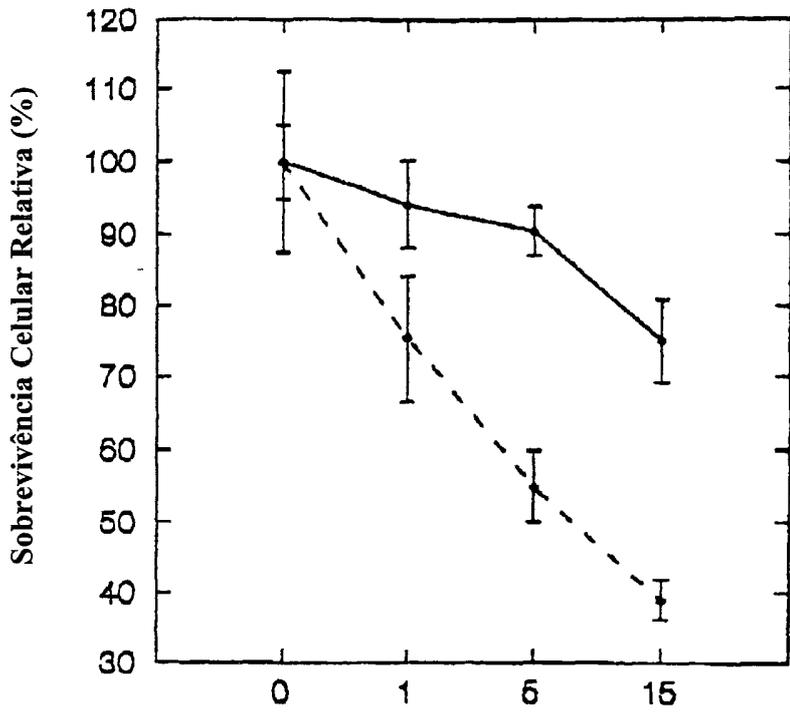


Fig. 31A

Concentração de dGAE na Mistura de Lipofectina (ug/ml)

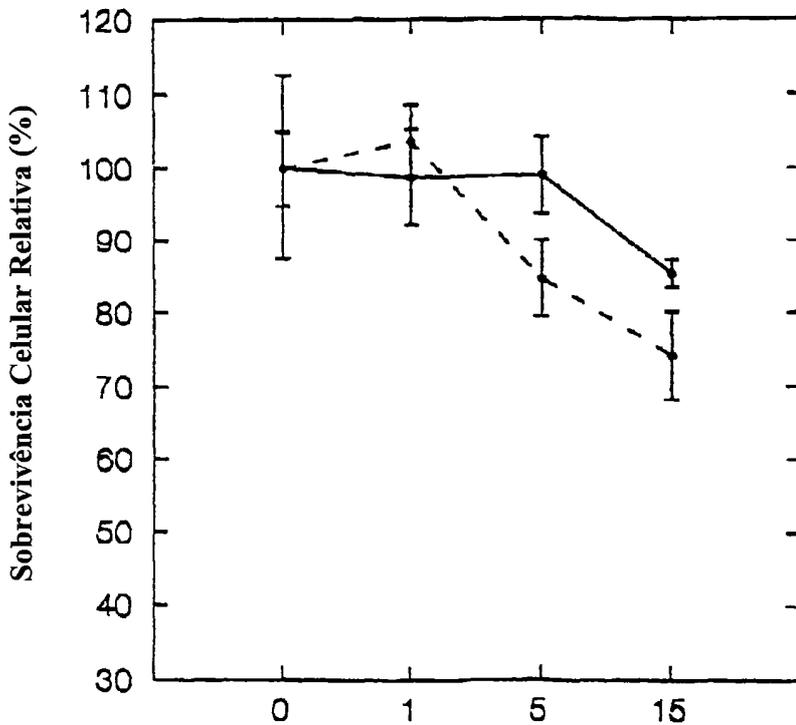


Fig. 31B

Concentração de T40 em Lipofectina (ug/ml)