



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências da Saúde

# **Doença de Alzheimer**

## **Imunoterapia contra Amiloide Beta**

**Magui da Silva Neto**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Medicina**  
(ciclo de estudos integrado)

Orientador: Professor Doutor Francisco José Alvarez Pérez

**Covilhã, Maio de 2014**

# Dedicatória

Este trabalho é dedicado às pessoas de quem mais gosto, que sempre me motivaram a seguir em frente e a conquistar todos os meus objetivos.

*“A cada dia que vivo, mais me convenço que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca e que, esquivando-se do sofrimento, perdemos também a felicidade”*

Carlos Drummond de Andrade

# Agradecimentos

As primeiras palavras de agradecimento vão para aquele que me soube guiar desde o primeiro dia, o Professor Doutor Francisco José Alvarez Pérez. Pela orientação, pela disponibilidade e simpatia.

À minha família e amigos, pelo apoio moral e carinho.

## Resumo

A doença de Alzheimer foi descrita pela primeira vez, há pouco mais de 100 anos, por Alois Alzheimer. Esta patologia é causa mais comum de demência, afetando cerca de 30 milhões de pessoas em todo o mundo. Esta patologia está-se a tornar num problema epidémico, estimando-se que, em 2050 a incidência anual atinja um milhão de pessoas apenas nos Estados Unidos da América. O facto de a idade constituir o principal fator de risco, aliado ao envelhecimento da população mundial, criam as condições ideais para este rápido aumento da incidência.

Macroscopicamente, a doença de Alzheimer caracteriza-se por atrofia cerebral difusa enquanto microscopicamente, duas lesões destacam-se: as mais precoces são as placas senis (depósitos de amiloide beta) e as mais tardias são os emaranhados neurofibrilares (depósitos de proteína tau hiperfosforilada).

A doença afeta maioritariamente idosos a partir dos 65 anos (a prevalência quase que duplica a cada 5 anos), sendo a apresentação antes dessa idade, considerada precoce. Outras características clínicas são o seu início insidioso, progressão lenta e inexorável, com disfunção cognitiva e funcional, conduzindo à demência e dependência total dos indivíduos. A morte ocorre em média 7 a 10 anos após o diagnóstico.

A doença de Alzheimer é tipicamente esporádica, ou seja, sem história familiar consistente com herança genética. Menos de 1% dos casos devem-se a mutações autossómicas dominantes nos genes ABPP, Preselina 1 ou Preselina 2, resultando inevitavelmente no início precoce da doença.

O tratamento atualmente aprovado é meramente sintomático, consistindo nos inibidores de acetilcolinesterase e num antagonista do receptor N-Metil-D-Aspartato (Memantina).

A hipótese da cascata amiloide defende que a doença de Alzheimer é uma proteinopatia, sendo a produção, agregação e deposição anormal de amiloide beta o evento desencadeante. Assim, teoricamente, se este distúrbio for prevenido ou revertido, pode-se interromper a progressão, ou mesmo o desenvolvimento clínico da doença.

Tendo em conta o atrás mencionado, a imunoterapia contra a amiloide beta representa uma estratégia potencialmente modificadora da evolução da doença, criada no sentido de reduzir, reverter ou mesmo prevenir as lesões e as manifestações clínicas.

Com esta tese pretendo rever a informação mais recente acerca de: amiloide beta, desde a sua formação ao seu papel na doença; e papel da imunoterapia contra amiloide beta nos indivíduos com doença de Alzheimer, desde o conceito até aos ensaios clínicos em humanos.

## Palavras-chave

*Amiloide Beta, Imunoterapia, Doença de Alzheimer, Anticorpos Anti-AB, Vacina.*

# Abstract

Alois Alzheimer first described Alzheimer's disease little more than 100 years ago. This condition is the most common cause of dementia, affecting around 30 million people worldwide. This pathology is to become an epidemic problem, it is estimated that by 2050 the annual incidence reaches a million people just in the United States. The fact that the age be the main risk factor, coupled with the aging of the world population, create ideal conditions for this rapid increase in incidence.

Macroscopically, Alzheimer's disease is characterized by diffuse brain atrophy while microscopically two lesions are included: the earliest are the senile plaques (amyloid beta deposits) and the later is the neurofibrillary tangles (hyperphosphorylated tau protein deposits).

The disease affects mainly elderly from 65 years (prevalence almost doubles every 5 years), and the presentation before that age is considered early. Other clinical features are its insidious onset, slow and inexorable progression with cognitive and functional impairment and dementia, leading to total dependence of individuals. Death occurs on average 7-10 years after diagnosis.

Alzheimer's disease is typically sporadic, ie no family history consistent with genetic inheritance. Less than 1% of cases are due to autosomal dominant mutations in ABPP, Presenilin 1 or Presenilin 2 genes, inevitably resulting in the early onset of disease.

The currently approved treatment is merely symptomatic, consisting of acetylcholinesterase inhibitors and an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist (Memantine).

The amyloid cascade hypothesis holds that Alzheimer's disease is a protein disorder and the production, abnormal aggregation and deposition of amyloid beta is the triggering event. Thus, theoretically, the prevention or reversion of this disorder can stop the progression, or even the development of clinical disease. Therefore, immunotherapy against amyloid beta, represents a potentially modifying the disease treatment, created to reduce, reverse or even prevent injury and clinical manifestations.

With this thesis I intend to review the latest information on: the amyloid beta, from its formation to its role in disease; and the role of immunotherapy against beta amyloid in subjects with Alzheimer's disease, from concept to clinical trials in humans.

# Keywords

*Beta amyloid, Immunotherapy, Alzheimer's Disease, Anti-AB Antibodies, vaccine.*

# Índice

Agradecimentos .....	iii
Resumo .....	iv
Palavras-Chave .....	v
Abstract .....	vi
Keywords .....	vii
Índice .....	viii
Lista de Figuras .....	x
Lista de Tabelas .....	xi
Lista de Acrónimos .....	xii
Introdução .....	2
A. Relevância do tema e justificação do título desta tese .....	2
B. Objetivo desta tese .....	2
C. Metodologia .....	2
I. Amiloide Beta .....	3
1.1. Formação do Amiloide Beta .....	3
1.2. Amiloide Beta na Doença de Alzheimer .....	5
1.3. Papel do Amiloide Beta na Doença de Alzheimer .....	7
1.4. Hipótese da Cascata Amiloide .....	8
II. Imunoterapia contra Amiloide Beta .....	10
2.1. Conceitos de Imunoterapia .....	10
2.2. Abordagem Ativa .....	13
2.2.1. Primeira Geração .....	13
2.2.1.1. AN1792 .....	13

---

2.2.2. Segunda Geração-----	16
2.2.2.1. ACC-001-----	16
2.2.2.2. CAD106-----	17
2.2.2.3. AFFITOPE-----	18
2.3. Abordagem Passiva -----	19
2.3.1. Bapineuzumab-----	19
2.3.2. GSK933776 -----	21
2.3.3. Solanezumab -----	22
2.3.4. Gantenerumab -----	24
2.3.5. Crenezumab -----	25
2.3.6. Ponezumab -----	26
2.3.7. BAN2401-----	27
2.3.8. BIIB037-----	28
2.3.9. Imunoglobulinas Intravenosas -----	28
2.4. Abordagem Preventiva -----	31
2.4.1. Dominantly Inherited Alzheimer Network -----	31
2.4.2. Alzheimer’s Preventive Initiative -----	32
2.4.3. Anti-Amyloid Treatment for Assymptomatic Alzheimer’s Diseas -----	32
III. Conclusões Finais -----	33
Referências Bibliográficas -----	36

# Lista de Figuras

Figura 1 - Vias de agregação e agregados amiloides intermédios-----	8
Figura 2 - Abordagem Imunoterapêutica ativa e passiva -----	11

## Lista de Acrónimos

- A4 = Anti-Amyloid Treatment for Assymptomatic Alzheimer's Disease
- AB = Amiloide Beta
- ABO = Oligómeros de Amiloide beta
- ABPP= Proteína Precursora de Amiloide Beta
- ACC = Angiopatia Amiloide Cerebral
- ADDL = Ligandos solúveis derivados da amiloide
- API = Alzheimer's Preventive Initiative
- ARIA = Anormalidades imagiológicas associadas à amiloide
- ASPD = Amilosferoides
- BHE = Barreira hemato encefálica
- C = Carboxila
- CE = Cranioencefálica
- C - PiB = Composto B de Pittsburgh
- DA = Doença de Alzheimer
- DAF = Doença de Alzheimer familiar
- DIAN = Dominantly Inherited Alzheimer Network
- FDG = Fluorodeoxiglicose
- H&E = Hematoxilina Eosina
- HMWO = Oligómeros de alto peso molecular
- IGIV = Imunoglobulinas Intravenosas
- IgG = imunoglobulina
- IL = Interleucina
- INF- $\gamma$  = Interferão gama
- IV = intravenosa
- Kg = Quilograma
- LCR = Líquido cefalorraquidiano
- LMWO = Oligómeros de baixo peso molecular
- LRP-1 = Receptor de lipoproteínas de baixa densidade 1
- MCI = Distúrbio Cognitivo Mínimo do inglês "Mild Cognitive Impairment"
- MCIa = Distúrbio cognitivo mínimo amnésico
- mg = Miligrama
- ml = Mililitro
- MMSE = Mini-Mental State Examination
- N = Amina
- ng = Nanograma
- PET = Tomografia por emissão de positrões
- pg = Petagrama
- PS = Preselina
- PSb-80 = Polissorbatado 80
- p-Tau = Proteína tau hiperfosforilada
- RAGE = Receptor de produtos finais da glicação
- RMN = Ressonância Magnética Nuclear
- sAPP $\beta$  = Proteína Precursora de Amiloide Beta Solúvel
- SNC = Sistema nervoso central
- TNF -  $\alpha$  = Fator de necrose tumoral alfa
- T-tau = Proteína tau total

# Introdução

## A. Relevância do tema

A doença de Alzheimer é a causa mais comum de demência, afetando cerca de 30 milhões de pessoas em todo o mundo.

Atualmente é considerada uma doença irreversível, que causa um dano funcional e cognitivo progressivo que conduz inexoravelmente à demência severa e dependência completa, sendo o tratamento, apenas sintomático.

A doença de Alzheimer está-se a tornar num problema de saúde pública epidémico, estimando-se que a incidência anual venha a atingir um milhão de pessoas.

A imunoterapia contra amiloide beta representa uma estratégia potencialmente modificadora da evolução da doença, criada no sentido de reduzir, reverter ou mesmo prevenir as lesões e as manifestações clínicas.

## B. Objetivo desta tese

O objetivo deste trabalho é melhorar a compreensão do papel do amiloide na doença de Alzheimer assim como estabelecer a evolução da imunoterapia e reunir os resultados obtidos em humanos com doença de Alzheimer.

## C. Metodologia

Foi efetuada uma pesquisa eletrónica nas seguintes bases de dados de medicina baseada na evidência: *PubMed, Medscapes e Clinicaltrials*.

A estratégia de pesquisa nestas bases envolveu os termos *Beta amyloid, Immunotherapy, Alzheimer's Disease, Anti-AB Antibodies*, os quais foram associados com o operador booleano "AND" de forma a obter os estudos adequados ao tema.

A pesquisa foi restrita aos últimos 10 anos e os artigos foram selecionados tendo preferência pela sua atualidade. Na pesquisa, não existiu restrição de idioma.

A pesquisa foi realizada entre 20 de Setembro de 2013 e 23 de Fevereiro de 2014.

É de realçar o contributo dos serviços centrais da Universidade da Beira Interior no acesso a vários artigos relevantes.

# Capítulo I. Amiloide Beta na Doença de Alzheimer

## 1.1. Formação do Amiloide Beta

O principal constituinte das placas amiloides é um péptido com 38 a 43 aminoácidos, o A $\beta$ , que deriva da clivagem proteolítica da A $\beta$ PP, . [1]-[6]

A A $\beta$ PP é uma proteína transmembranar do tipo I, codificada por um gene presente no cromossoma 21. [4], [7] Esta proteína está presente em três isoformas diferentes, constituídas por 695, 751 ou 770 aminoácidos. A isoforma mais curta é predominantemente expressa nos neurónios ao contrários das isoformas mais longa. [4]

A A $\beta$ PP é processada sequencialmente pela ação de, pelo menos, 3 isoenzimas diferentes, denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  secretases. O primeiro evento proteolítico consiste na clivagem do domínio extracelular ou luminal da A $\beta$ PP pela secretase  $\alpha$  ou  $\beta$  seguido da clivagem transmembranar pela  $\gamma$ -secretase. [4], [6]

A clivagem proteolítica do domínio extracelular pela  $\alpha$ -secretase não resulta na formação de A $\beta$ 40, sendo denominado de processamento não amiloidogénico. [4], [6]

Assim sendo, para a formação de A $\beta$  a partir de A $\beta$ PP são necessárias duas clivagens sequências. A primeira ocorre no domínio extracelular pela  $\beta$ -secretase (processamento amiloidogénico) e resulta na formação de sAPP $\beta$  (proteína precursora de amiloide A $\beta$  solúvel) e num péptido C-terminal de 99 aminoácidos (C99), enquanto que a segunda ocorre na região transmembranar pela  $\gamma$ -secretase e resulta na clivagem do C99 e libertação do péptido A $\beta$ . [4], [6]

O processamento amiloidogénico é favorecido nos neurónios devido à abundância de  $\beta$ -secretase, enquanto que a via não amiloidogénica predomina nos outros tipos de celulares. [4]

Evidências recentes indicam que a proteólise da A $\beta$ PP pela  $\gamma$ -secretase ocorre em três sítios diferentes do domínio transmembranar, e que a diversidade de sítios de clivagem, resulta em péptidos A $\beta$  de diferentes comprimentos. As formas mais abundantes no cérebro são as constituídas por 40 e 42 aminoácidos (A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42), com uma proporção de A $\beta$ 42 para A $\beta$ 40 de, aproximadamente 10%. No entanto, a região C-terminal do A $\beta$  tem importantes implicações tóxicas, verificando-se que as formas mais longas de A $\beta$ , como o A $\beta$ 42, tem mais

tendência para oligomerizar e exibem propriedades neurotóxicas mais acentuadas. Outras formas de A $\beta$ , como as N-terminais truncadas, estão normalmente presentes no cérebro de indivíduos com DA. [4] [1]

## 1.2. Amiloide Beta na Doença de Alzheimer

### Níveis cerebrais de AB

Níveis inferiores de AB42 foram detetados no LCR de indivíduos com DA (em média 330 pg/ml) do que no LCR de indivíduos controlo saudáveis (600 pg/ml), apesar de os níveis de AB40 no LCR serem semelhantes entre os indivíduos com DA (4.4 ng/ml) e os indivíduos controlo (4.0 ng/ml). [5]

Estudos demonstraram que os níveis baixos de AB no LCR de indivíduos com DA se correlacionavam inversamente com a angiopatia amiloide cerebrovascular (ACC) e com a deposição de placas amiloides no córtex frontal. [5]

À medida que a idade aumenta, ocorre uma diminuição da razão entre a quantidade de AB cerebral e o número placas amiloides, tanto em indivíduos saudáveis como em portadores da DA. A diminuição de AB42 no LCR é maior do que a de AB40, consistentemente com a expressão preferencial de AB42 nas fibrilas insolúveis e nas placas amiloides. [5]

### Níveis plasmáticos de AB

Os níveis plasmáticos de AB foram medidos pelo imunoensaio ELISA, num grande número de indivíduos saudáveis e com DA. Como no LCR, os níveis plasmáticos de AB40 foram superiores (120-170 pg/dl) aos de AB42 (20-100 pg/ml). [5]

Os níveis de AB foram 50 a 500 vezes menores no sangue do que no LCR. Esta diferença deve-se à maior ligação de AB às proteínas plasmáticas e aos anticorpos anti-AB. [5]

O aumento associado à idade nos níveis plasmáticos de AB40 e AB42 contrastam com a diminuição dos mesmos no LCR. [5]

A medição do nível plasmático total de AB40 e AB42 (após a dissociação do AB ligado e a separação cromatográfica das proteínas séricas) revelou uma concentração média de AB42 de 21.4 ng/ml em indivíduos com DA e de 20.6 ng/ml em controlos saudáveis enquanto a concentração média de AB40 foi de 10.9 ng/ml em indivíduos com DA e de 7.6 ng/ml em controlos saudáveis. Assim, a diferença entre a concentração de AB no sangue e no LCR foi muito menor do que a medida pelo método ELISA. [5]

A semelhança na concentração total de AB no LCR e no plasma é consistente com o equilíbrio mantido por diversos sistemas de transporte ativo ao longo da BHE. [5]

### **Resposta imune Humoral ao AB**

Os linfócitos B têm a capacidade de produzir anticorpos contra AB. [5]

Um estudo mostrou que a percentagem de linfócitos B produtores de anticorpos anti-AB é maior nos portadores de DA (2%) do que nos controlos saudáveis (0.2%). Não se sabe o número superior de linfócitos se correlaciona com níveis plasmáticos superiores de anticorpos anti-AB. [5]

Vários estudos demonstraram a presença de anticorpos anti-AB no sangue e LCR tanto de indivíduos com DA como de indivíduos saudáveis. No entanto, quando se tentou determinar qual o grupo com maiores títulos, os resultados foram contraditórios.[5]

### **Resposta imune Celular ao AB**

A resposta humoral ao péptido AB depende da atividade das células T helper, a qual está comprometida nos idosos (imunosenescência). [5]

Alguns estudos apontam para uma alteração mais acentuada da resposta celular T ao péptido AB nos indivíduos com DA quando comparada com indivíduos saudáveis. [5]

### 1.3. Papel do Amiloide Beta na Doença de Alzheimer

O papel do AB na promoção da disfunção e morte neuronal não é bem compreendida, mas diversos dados sugerem que este promove a inflamação, danifica as membranas celulares e as células microgliais e que altera a homeostasia celular do cálcio. [4]

Um estudo publicado em 2013, defende que as características físicas das fibrilhas amiloides, nomeadamente, a sua estabilidade química, insolubilidade, estrutura anfipática, capacidade de ligação ao metal e ao heme e a sua habilidade para interagir com a matriz extracelular e gerar redes resilientes parecidas com as geradas pela cascata de coagulação, fazem da amiloide uma substância ideal para proteger e reparar a microvasculatura cerebral. Assim, pensa-se que a excreção contínua e excessiva de amiloide em torno dos microvasos cerebrais pode culminar na constrição do lúmen, criando capilares “cegos” que diminuem a perfusão cerebral, promovendo a disfunção e morte neuronal. [8]

## 1.4. Hipótese da Cascata Amiloide

A hipótese da cascata amiloide, formulada em 1991 por Hardy e Allsop [5], [9], [10], defende que a DA consiste num processo contínuo de acumulação, agregação e deposição de AB no cérebro, desencadeando uma cascata neurodegenerativa complexa que resulta no declínio cognitivo progressivo e demência, característicos da DA. [4], [11] Também defende que a patologia tau e as outras alterações degenerativas são consequentes à patologia AB, não se sabendo ao certo como. [4]

Os monómeros ativos de AB, gerados pela clivagem proteolítica de APP $\beta$ , agregam-se em formas intermédias transitórias culminando na produção de fibrilas, que se acumulam no cérebro de pacientes com DA na forma de placas amiloides. Esta agregação resulta em espécies de AB com diferentes morfologias e pesos moleculares. [2]

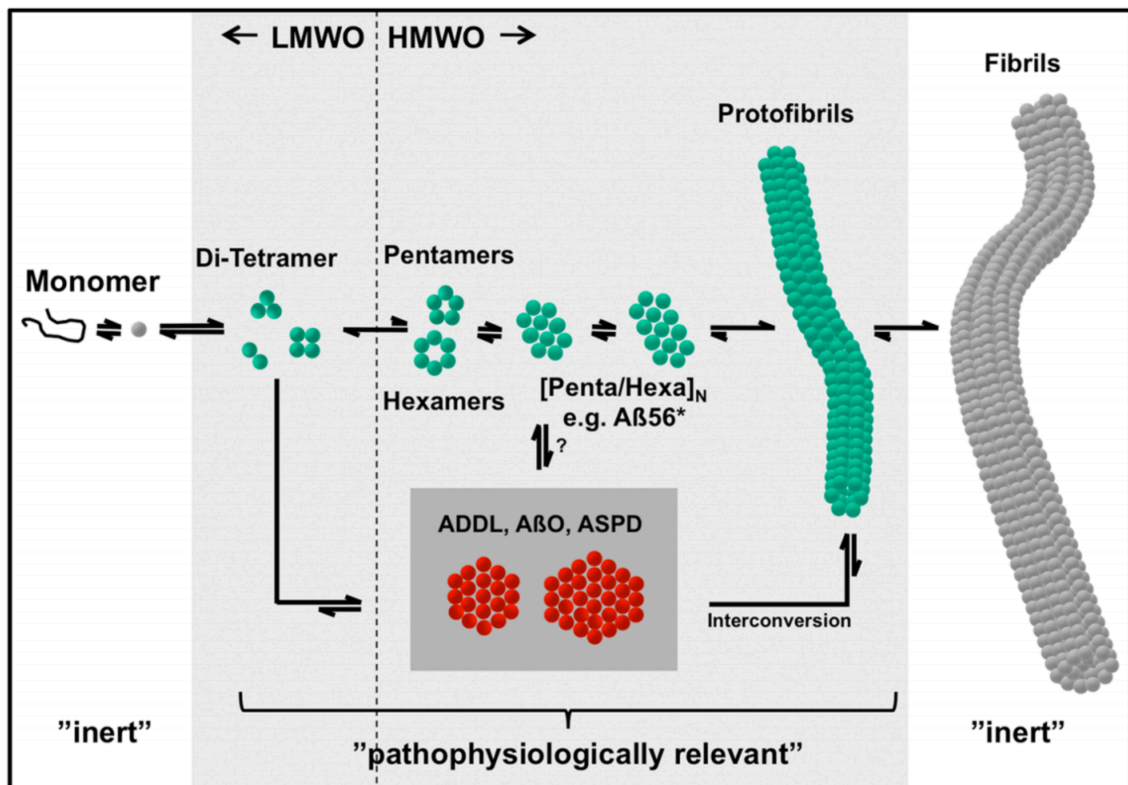


Figura 1. Vias de agregação e agregados amiloides intermédios. [2]

Acredita-se que as formas monoméricas e fibrilares de AB são biologicamente inertes (insolúveis), no entanto, as fibrilhas de AB podem regredir para as formas oligoméricas intermédias (solúveis) na presença de lípidos. [2]

Originalmente, esta teoria defendia que as fibrilas depositadas na forma de placas amiloides eram a espécie responsável pelo desencadeamento da cascata neurodegenerativa. Esta ideia surgiu a partir de estudos que demonstravam a toxicidade desta espécie em neurónios em

cultura. [2] No entanto, estudos subsequentes mostraram um fraca relação entre a quantidade e área das placas amiloides cerebrais e a severidade da demência. [2], [4], [10]

Até agora, as formas oligoméricas são as que melhor se correlacionam com o declínio neuropsiquiátrico e perda neuronal. Utilizando-se anticorpos marcados contra espécies sintéticas de A $\beta$ , verificou-se que os cérebros de pacientes com DA tinham níveis de espécies oligoméricas 70 vezes superiores quando comparadas com os cérebros de indivíduos controle saudáveis. [2] Assim grandes esforços têm sido feitos na tentativa de identificar os agregados A $\beta$  intermédios, resultando na descrição de uma plétora de espécies A $\beta$ , com peso e morfologia sobreponíveis. [2]

Assim a Hipótese da Cascata Amiloide foi reformulada de maneira a incluir a possibilidade de múltiplas espécies de A $\beta$  poderem contribuir para a patogénese da doença. [11] [2]

Tendo em conta o acima mencionado, é possível prever que se a acumulação de A $\beta$  no cérebro for atenuada ou prevenida, todas as fases subsequentes da patogénese da DA também serão. É este o conceito chave que sustenta a imunoterapia contra amiloide beta. [11]

# Capítulo II. Imunoterapia contra Amiloide Beta

Em meados da década de 90, Bekas Solomon foi o primeiro a demonstrar que os anticorpos monoclonais anti-AB dissolviam e preveniam a formação de agregados de AB *in vitro*, sugerindo que a terapia anti-AB poderia tratar ou mesmo prevenir a DA. [12], [13]

## 2.1. Conceitos de Imunoterapia

A imunoterapia consiste na manipulação do sistema imunitário ao induzir, estimular ou suprimir respostas imunes *in vivo*. [14] Existe dois tipos de imunoterapia, a vacinação ativa e a vacinação passiva. [12], [14]

A vacinação ativa estimula o sistema imune, a produzir anticorpos contra um antígeno específico. Tipicamente, uma vacina ativa é composta por um antígeno combinado com um adjuvante que estimula o sistema imune e desta forma, garante altos títulos de anticorpos. [12], [14] (Figura 3)

Uma vantagem associada à vacinação ativa é a capacidade de um pequeno número de injeções induzir uma resposta imunitária de longo prazo, custo-efetiva, reduzindo a necessidade de acompanhamento médico. No entanto, a esta técnica está associada a uma resposta individual variável, particularmente nos idosos, devido à imunosenescência, associada à menor produção de anticorpos e a uma maior incidência de efeitos adversos autoimunes. Além do mencionado, a vacinação ativa gera uma resposta imune policlonal, possibilitando o reconhecimento de múltiplos epitotos na proteína alvo. Esta característica pode ser benéfica quando se pretende uma cobertura mais ampla, mas também desvantajosa quando o alvo é mais específico. [4], [5], [12], [13], [15]

A imunização passiva envolve a injeção direta de anticorpos (ou fragmentos dos mesmos) sem necessitar que o sistema imune produza anticorpos. [12], [14] (Figura 3) Vantagens desta técnica incluem o facto de: não depender do sistema imune, muitas vezes senescente, para a produção de anticorpos; poder ser interrompida imediatamente, caso surja algum efeito secundário adverso e o facto de possibilitar a escolha de anticorpos monoclonais ( mais específicos) ou policlonais (espectro de ação amplo). Por outro lado, a imunização passiva requer a produção de anticorpos humanizados e injeções mensais no consultório médico, tornando-a uma opção mais dispendiosa, logo menos realista, para o tratamento em massa a longo prazo. Adicionalmente, doses repetidas de anticorpos podem conduzir, ao longo do

tempo, à formação de auto-anticorpos, que podem ter um efeito neutralizante e/ou efeitos secundários potenciais, como a glomerulonefrite ou a vasculite. [4], [5], [12], [13], [15]

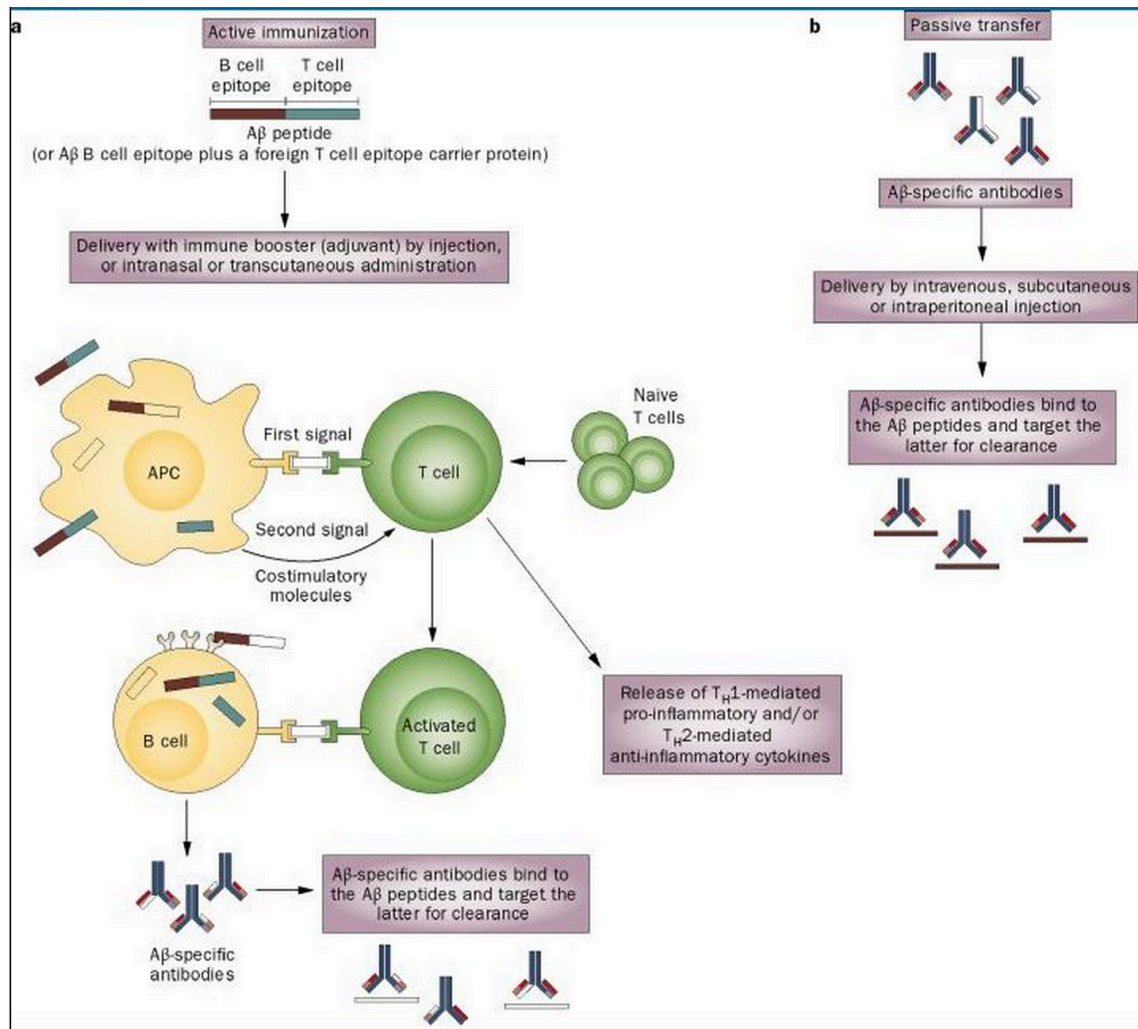


Figura 2. Abordagem Imunoterapêutica ativa e passiva. a) Ativa b) Passiva [13]

Os anticorpos anti-Aβ gerados após a imunização ativa ou administrados passivamente ajudam a eliminar o Aβ por diferentes mecanismos. [1], [2], [13]-[17]

### Fagocitose mediada pela Microglia

Um modelo, apresentado por Bard e colegas em 2000, mostrou que anticorpos administrados periféricamente, entravam no SNC e ligavam-se às fibrilhas de Aβ, com subsequente recrutamento de microglia e fagocitose do complexo anticorpo-fibrilha Aβ a partir da ligação ao receptor Fc. Este mecanismo requer que os anticorpos atravessem a BHE e que se liguem ao Aβ dentro do SNC. [1], [2], [13]-[17]

### **Hipótese do Sequestro Periférico**

Baseia-se na descoberta que o A $\beta$  entra ativamente no SNC por um receptor para produtos finais da glicação (RAGE) e que sai ativamente por um receptor de lipoproteínas de baixa densidade (LRP-1), sugerindo que estes mecanismos mantêm o A $\beta$  num complexo equilíbrio entre a periferia e o cérebro. [16]

Utilizando anticorpos m266, um anticorpo com alta afinidade para um epitoto central de A $\beta$ , De Mattos e colegas, foram capazes de sequestrar o A $\beta$  na periferia, prevenir o transporte de A $\beta$  de volta para o cérebro e mudar o equilíbrio para o efluxo cerebral de de A $\beta$ . [1], [16] Surgiu assim a hipótese que a acumulação de A $\beta$  no plasma gerava um desequilíbrio osmolar, favorecendo o efluxo de A $\beta$  a partir do cérebro para a periferia, onde é subsequentemente degradado. [1], [2], [13]-[17]

### **Bloqueio da formação ou da atividade neurotóxica das espécies solúveis de A $\beta$**

Estudos *in vitro* realizados por Solomon e colegas entre 1996 e 2000, previam que os anticorpos contra a porção N- terminal do A $\beta$  poderiam inibir a agregação e ligar-se a fibrilas de A $\beta$  preexistentes, resultando na desagregação e proteção contra os seus efeitos citotóxicos. [1]. Estudos subsequentes identificaram os resíduos N-terminais do A $\beta$  (aminoácidos 3-6) como o epitoto mínimo para o desempenho desta atividade. [1], [16] Assim, pensa-se que os anticorpos que penetram a BHE produzem um rápido efeito na aprendizagem e memória através da remoção de várias espécies solúveis e tóxicas de A $\beta$ , independentemente de qualquer efeito nas placas amiloides. [1], [2], [13]-[17]

Estes mecanismos não são mutuamente exclusivos e podem ser dependentes do estágio da doença. Por exemplo, uma vacina preventiva (antes da acumulação cerebral de amiloide) pode não requerer que os anticorpos atravessem a BHE. Pelo contrário, uma vacina terapêutica (após a deposição de placas) irá beneficiar do transporte de anticorpos para o SNC. [13], [16], [17]

Estudos demonstraram que os anticorpos administrados sistemicamente penetram a BHE, embora apenas 0.1% a 0.5% o façam efetivamente. A forma como a imunoterapia anti- A $\beta$  tem efeitos tão dramáticos no SNC apesar dos níveis de anticorpos anti- A $\beta$  no SNC serem baixos, permanece por esclarecer. [15], [16]

## 2.2. Abordagem Ativa

### 2.2.1. Primeira Geração

Em 1999, Schenk publicou os resultados da imunização ativa de ratos transgênicos. Ratos transgênicos, que exibiam placas amiloides foram vacinados com uma forma sintética e pré-agregada de Aβ1-42. Os anticorpos anti-Aβ gerados após a imunização tanto preveniram a deposição das placas como conduziram à redução do número de placas pré-estabelecidas no cérebro destes animais. Adicionalmente, a vacinação atenuou a gliose, a distrofia neurítica e melhorou os resultados nos testes cognitivos. [4], [5], [12], [14], [16] Esta descoberta inesperada foi reproduzida centenas de vezes, expandindo tanto o conhecimento acerca dos mecanismos de ação como das respostas biológicas resultantes. [4], [5], [16]

#### 2.2.1.1. AN1792

Baseado nos resultados pré-clínicos, o laboratório Elan Pharmaceuticals estendeu a imunização ativa a humanos, o que resultou na primeira vacina contra Aβ, a AN1792. Esta vacina consistia numa forma agregada sintética do péptido Aβ42 com o adjuvante QS-21, (estimulador da resposta imunitária Th1). [1], [4], [12]-[15], [18]

A fase 1 do ensaio, que pretendia avaliar a segurança da AN1792, começou em Dezembro de 1999 em 80 indivíduos com DA leve a moderada. Estes pacientes foram randômicamente distribuídos para um de quatro grupos: AN1792, IN1792 e QS-21, QS-21 ou Placebo. Os pacientes receberam quatro vacinas intramusculares ao longo de 6 meses. Nenhum efeito adverso foi observado, e a vacina foi considerada segura e bem tolerada. [4], [12], [13]

A Fase 2 arrancou em Outubro de 2001. Este ensaio tinha como objetivo demonstrar a eficácia da infusão de AN1792 mais adjuvante QS-21. Um total de 372 pacientes com DA leve a moderada participaram neste estudo duplo cego, placebo-controlo, multicêntrico. Dos 300 indivíduos que receberam AN1792 com QS-21, 223 completaram o estudo, enquanto que dos 72 sujeitos que receberam placebo, 53 completaram o estudo. [4], [13] Os indivíduos que desenvolveram títulos de anticorpos anti-Aβ superiores a 1:1000 após imunização, foram classificados como respondedores. [4], [13], [18]

No geral, a resposta imune à infusão de AN1792 com QS-21 foi moderada com apenas 23% dos pacientes a serem classificados como respondedores. Para aumentar a estabilidade e a imunogenicidade da vacina, o protocolo do estudo foi corrigido para incluir uma extensão de 84 semanas em que se adicionou 0.4% de polissorbato 80 (PSb-80) à fórmula da AN1792. A adição de PSb-80 aumentou o número de respondedores para cerca de 60%. [4], [13], [18]

O ensaio foi interrompido em Agosto de 2002, pelo desenvolvimento de meningoencefalite asséptica em 6% dos indivíduos que receberam a vacina. [1], [4], [12]-[15], [18]

Apesar da interrupção do ensaio, os indivíduos imunizados foram acompanhados e consistentemente avaliados ao longo do tempo. Nos indivíduos que consentiram foi também realizada autópsia. [1], [4], [12]-[15], [18]

Dos 80 pacientes que entraram na Fase 1 do ensaio clínico, apenas oito foram autópsados. Observou-se uma diminuição das placas amiloides nos indivíduos imunizados, sendo esta redução proporcional aos títulos de anticorpos produzidos. Num subgrupo de respondedores o nível cefalorraquidiano de proteína Tau também se mostrou reduzido em relação ao grupo placebo. [4], [13] Durante o ensaio, os indivíduos imunizados tiveram um declínio cognitivo mais lento do que os controlos, embora, todos apresentassem demência severa na altura da morte. [13]

Após a suspensão da Fase 2 do ensaio, 30 indivíduos que participaram no estudo em Zurich continuaram a ser acompanhados. A análise destes sujeitos revelou que os respondedores tiveram um retardo significativo da taxa de declínio cognitivo apesar do nível plasmático e cefalorraquidiano de A $\beta$  se manter inalterado, indicando que os efeitos terapêuticos não se deviam ao sequestro periférico de A $\beta$ . [4], [13]

Um estudo *follow up*, acompanhou um subgrupo de indivíduos que participaram na fase 2 do ensaio por 4 anos e meio. Neste estudo, constatou-se que a maioria dos respondedores ainda tinha níveis detetáveis de anticorpos anti-A $\beta$  e que estes indivíduos tinham uma taxa de declínio cognitivo marcadamente reduzida quando comparados com os indivíduos tratados com placebo. Além disso, a RMN CE mostrou uma redução do volume cerebral mais acentuada nos respondedores do que no grupo placebo, sugerindo uma dissociação entre a perda de volume cerebral e a função cognitiva nestes sujeitos. Apesar do volume hipocampal ser pequeno nos indivíduos imunizados com AN1792, este estabilizou depois de alguns meses. No entanto, no grupo que recebeu apenas adjuvante (QS-21), o volume hipocampal continuou a decrescer ao longo dos 4.6 anos que se seguiram. [13], [18]

Há quem defenda que a redução do volume cerebral pode dever-se ao facto da neurodegeneração e atrofia do hipocampo já estarem muito avançados quando a amiloide é removida. Alguns pensam que a remoção de amiloide pode ser acompanhada por mudanças dinâmicas nos fluidos, que conduzem a uma extensa redução do volume hipocampal. Outros preconizam que a dissociação entre a perda de volume cerebral e a performance cognitiva pode também refletir alguns efeitos negativos da vacinação nas fibras ou no volume da matéria branca. Existem inúmeras possíveis explicações para esta dissociação, apesar de nenhuma ter sido comprovada.

Recentemente, Holmes e colegas, publicaram os resultados de um estudo que acompanhou os indivíduos que participaram no ensaio da AN1792 durante seis anos. Este estudo mostrou menor deposição de AB em sujeitos imunizados quando comparados ao grupo placebo. A extensão da redução de AB correlacionava-se com os títulos de anticorpos formados. No entanto, o estudo não encontrou uma diferença estatisticamente significativa na função cognitiva ou na sobrevivência entre o grupo que recebeu AN1792 e o placebo, mesmo nos indivíduos com os maiores níveis de anticorpos. [4], [14], [19], [20]

Apesar da boa tolerabilidade e marcada redução das placas amiloides, vários pacientes desenvolveram inflamação do SNC e pioraram da demência, na altura da morte. [4], [12]

Estudos histopatológicos foram executados no cérebro de três dos 18 indivíduos que desenvolveram meningoencefalite asséptica. [4]

A análise neuropatológica dos três indivíduos revelou uma forma invulgar de meningoencefalite, caracterizada por infiltrados de células T e macrófagos nas leptomeninges, principalmente, nas áreas com AAC. Adicionalmente, havia infiltrado linfocítico esparso no córtex cerebral, no espaço perivascular, nas áreas de AAC e no parênquima. O exame imunohistoquímico dos infiltrados linfocíticos identificaram células T, a maioria das quais, células T helper (Th) e uma minoria de células T citotóxicas, sem células B. [4] Assim, após investigação exaustiva, conclui-se que a adição do PSb-80 à fórmula de AN1792, apesar de aumentar o número de respondedores, também alterou o tipo de resposta imune de predominantemente Th2 para a forma pró-inflamatória Th1, promovendo uma resposta autoimune mediada pelas células T à AB sintética, a qual resultou em neurotoxicidade e inflamação cerebral. [4], [12], [13], [19]

A patologia AB e Tau foi estudada em duas das 3 autopsias. Em indivíduos imunizados, observou-se: redução da quantidade de placas amiloides cerebrais apesar dos níveis plasmáticos AB e da ACC permanecerem inalterados e a redução da agregação da proteína tau dentro dos filamentos do neurópilo apesar de não haver alteração da quantidade de emaranhados neurofibrilares. [1], [4], [12], [14], [19]

Apesar da imunização com AN1792 não alterar os depósitos vasculares de amiloide nos indivíduos com AAC, múltiplas microhemorragias foram detetadas no córtex cerebral destes sujeitos. Permanece incerto se estas lesões estão diretamente relacionadas com a imunização, no entanto, foi reportado um aumento na incidência de microhemorragias após imunização passiva contra AB (Ver capítulo III, Abordagem Passiva). Estes resultados sugerem que os indivíduos com doença de Alzheimer devem ser avaliados quanto à presença e severidade da AAC antes de iniciarem técnicas de imunoterapia anti-AB. [1]

Também foram realizadas autópsias a indivíduos imunizados que não desenvolveram meningoencefalite. Num estudo, o cérebro de 9 sujeitos foi examinado 4 meses e 5 anos após a imunização com AN1792, revelando uma deposição cerebrovascular de A $\beta$ 1-42 marcadamente diminuída, quando comparados ao cérebro de indivíduos com DA não imunizados. Surpreendentemente, uma ausência completa tanto de placas amiloides como de CAA foi observada em dois pacientes que morreram 4 e 5 anos após a primeira imunização, levantando a possibilidade de que a longo prazo, a A $\beta$  seja eventualmente eliminada da vasculatura cerebral.

### 2.2.2. Segunda Geração

Para evitar a ativação das células T, responsável pelo desenvolvimento de meningoencefalite subsequente à imunização com A $\beta$ 42, Sigurdsson e colegas procuraram derivados do péptido A $\beta$  que não expressassem o epitoto da célula T. Um algoritmo informático identificou-o na região medial e C-terminal de A $\beta$ , o que mais tarde se confirmou em estudos experimentais. [5], [12] Esta descoberta foi crucial para o desenvolvimento de uma segunda geração de vacinas pépticas ativas que contêm o epitoto da célula B (primeiros 15 aminoácidos do A $\beta$ 42) necessária para a produção de anticorpos mas que evitam a ativação nefasta das células T. [1], [12], [19]

O ensaio clínico com a AN1792, deixou claro que as vacinas ativas devem favorecer a resposta imune do tipo Th2 em detrimento do tipo Th1. As células Th1 são ativadas pela IL2 e produzem citocinas pró-inflamatórias como o INF- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$ . As células Th2 são ativadas pela IL4 e produzem IL4 e IL10, inibem a atividade Th1 e induzem uma resposta humoral pelas células B. As células Th1 influenciam a troca de classe das imunoglobulinas conduzindo à formação de anticorpos IgG<sub>2a</sub>, enquanto que as células Th2 promovem a produção de anticorpos IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2b</sub>. Assim, espera-se que as vacinas que ativam as células Th2 promovam uma resposta imune humoral e que suprimam a encefalite autoimune. [1], [4] A escolha do adjuvante usado nas vacinas também tem efeitos moduladores na resposta Th1 versus Th2. O alumínio induz primariamente uma resposta Th2 enquanto que o adjuvante TiterMax® Glod, o adjuvante completo de Freund e o QS21 induzem predominantemente uma resposta Th1. [1]

#### 2.2.2.1. ACC-001

Desenvolvida pelos laboratórios Janssen and Pfizer, a vacina ativa ACC-001, é constituída pela região N-terminal do A $\beta$  (A $\beta$ 1-6), toxina diftérica e o adjuvante QS-21 (descrito na vacina AN1792). [4], [12], [15], [16]

Os ensaios de Fase 1 mostraram que a imunização com ACC-001 é segura e bem tolerada. [13], [15]

Segundo o site [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) vários estudos de Fase 2 foram realizados para estudar a segurança, tolerabilidade e imunogenicidade de múltiplas doses crescentes de ACC-001 em indivíduos com DA leve a moderada. Os resultados ainda não foram divulgados.

Sabe-se que um ensaio de Fase 2, onde participaram 360 sujeitos com DA leve a moderada, teve de ser brevemente interrompido devido ao desenvolvimento de lesões cutâneas num paciente. No entanto, nenhum dos efeitos adversos reportados com o uso de AN1792 foi observado. [13]

Atualmente um estudo multicêntrico, randomizado, duplamente cego, placebo-controlo, de fase 2, está a recrutar indivíduos com DA leve para avaliar a segurança, tolerabilidade e a capacidade da ACC-001, tem de remover as fibrilhas de AB cerebrais. Os sujeitos serão divididos em 3 grupos experimentais podendo receber 3µg ACC-001, 10 µg ACC-001 ou placebo no dia 1 e meses 1, 6, 12 e 18. Os indivíduos serão acompanhados ao longo de 24 meses. A deposição de amiloide será avaliada por PET. [12], [15], [21]

#### **2.2.2.2. CAD-106**

Em 2001 o laboratório Cytos Biothnology em parceria com a Novartis, desenvolveu uma vacina ativa, a CAD106 constituída por múltiplas cópias do péptido AB1-6 acopladas a uma partícula viral QB. [4], [6], [12], [15]-[17], [22]-[24]

Em estudos animais, a imunização com CAD 106 foi capaz de interferir com a agregação de AB, bloqueando a formação de placas amiloides cerebrais.[23], [15] De acordo com o estudo, os anticorpos anti-AB ligam-se a diferentes agregados de AB incluindo oligómeros e fibrilhas tóxicas sendo capazes de neutralizar a toxicidade induzida por estas espécies. [23] A imunização com CAD106 preveniu a acumulação de placas amiloides cerebrais em dois ratos transgénicos APP, com uma redução de 80% na área das placas quando comparada com o grupo controlo. [24]

O ensaio clínico randomizado, duplo-cego, placebo-controlo de fase 1 foi realizado na Suécia em 58 pacientes com DA leve a moderada. Este estudo pretendia avaliar a segurança, tolerabilidade e resposta humoral à imunização com CAD106. Os participantes receberam três vacinas com doses de 50µg ou 150µg. Títulos baixos de anticorpos foram observados com 50µg de CAD-106, no entanto, com doses de 150µg, o título de anticorpos foi duas vezes superior. Não foram observadas diferenças clínicas nos níveis cefalorraquidianos de AB ou no volume cerebral entre os indivíduos imunizados e os que receberam placebo. [4], [12], [13], [17], [22], [24], [25]

Cinquenta e seis dos 58 indivíduos que participaram no estudo reportaram efeitos adversos. No grupo que recebeu 50µg de CAD106, a nasofaringite foi o evento adverso mais comum,

enquanto que no grupo que recebeu 150µg, o efeito adverso mais comum foi eritema no local da infusão. No geral, 9 sujeitos experimentaram efeitos adversos sérios, nenhum associado ao fármaco em estudo. Não foi observado nenhum caso clínico ou subclínico de meningoencefalite. [24] A vacina foi considerada segura sendo capaz de gerar uma resposta humoral específica contra Aβ sem sinais adversos de inflamação autoimune em humanos. [4], [12], [13], [17], [22]

Segundo o site [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) vários ensaios multicêntricos, randomizados, duplo-cego, placebo-controlo de fase 2 foram concluídos. Estes estudos pretendiam avaliar a segurança e tolerabilidade de injeções subcutâneas repetidas de CAD106. Os resultados ainda estão pendentes. [12], [13]

### **2.2.2.3. AFFITOPE**

O laboratório Affiris AG criou uma vacina sintética ativa, a AFFITOPE. Em vez de utilizar o péptido Aβ, esta abordagem utiliza como antígeno, péptidos que mimetizam a região N-terminal do Aβ, os mimotopos. [4], [12], [16], [26]

Os mimotopos são péptidos que imitam funcionalmente o epitopo do antígeno natural, mas que não compartilham a sequência de aminoácidos. Assim, embora diferentes do antígeno original, os mimotopos são capazes de induzir anticorpos que reagem com o antígeno original. A maior vantagem oferecida por esta vacina prende-se ao facto de esta não ser constituída por auto-proteínas (como o Aβ), não induzindo mecanismos de tolerância que previnem a indução de resposta imune ao antígeno. [4], [26]

Dois ensaios multicêntricos, randomizados, duplo-cego, placebo-controlo de fase 1 foram conduzidos, cada um em 24 pessoas com DA leve a moderada. Estes estudos pretendiam testar a segurança e tolerabilidade da injeção subcutânea repetidas de duas vacinas que mimetizam partes da sequência de Aβ, a AD01 e a AD02. Ambas as vacinas se mostraram seguras, após 4 doses individuais com 4 semanas de intervalo. [6]

Está a decorrer um estudo multicêntrico, randomizado, duplo cego, placebo controlo de fase 2 que pretende avaliar a segurança e atividade clínica da vacinação contínua com AFFITOPE AD02. Duzentos e cinquenta sujeitos com DA e idade compreendida entre os 50 e os 85 anos, receberão uma dose subcutânea de AFFITOPE AD02, sozinho ou com o adjuvante hidróxido de alumínio, a cada 4 semanas, num total de 4 doses. O término do estudo está previsto para Junho de 2015. [27]

## 2.3. Abordagem Passiva

### 2.3.1. Bapineuzumab

Em 2000, Bard e colegas, foram os primeiros a demonstrar que a infusão sistêmica de anticorpo monoclonal, o 3D6, específico contra a região N-terminal do AB (Aβ3-6), em ratos transgênicos para a DA, resultava na entrada no SNC, ligação às placas amiloides e a indução de fagocitose microglial dos depósitos de AB.[5], [12], [13], [16]

Em 2002, o laboratório Pfizer, reportou que a administração repetida do anticorpo 3D6 em ratos transgênicos para a mutação no gene ABPP e com grande deposição vascular de amiloide, estimulava a *clearance* das placas amiloides e que reduzia significativamente os níveis cefalorraquidianos de AB, a inflamação, a distrofia neurítica e a perda sináptica, revertendo agudamente os deficits de memória. No entanto, verificou-se uma maior ocorrência de edema vasogênico e microhemorragias. Este estudo foi reproduzido inúmeras vezes e os resultados foram sempre coincidentes com o mencionado previamente. [2], [16]

O Bapineuzumab, derivado do 3D6, foi primeiro anticorpo monoclonal usado na imunoterapia passiva de indivíduos com DA ligando-se a epitotos N-terminais presentes nas formas fibrilares de AB [2], [4], [14], [16], [28]

O primeiro ensaio clínico de fase 2, arrancou em 2005, com o objectivo de avaliar a segurança, tolerabilidade e eficácia do Bapineuzumab, sendo conduzido em 234 indivíduos com DA leve a moderada. Os pacientes foram randomicamente distribuídos para receber uma de quatro doses IV de Bapineuzumab ou placebo (0.15, 0.5, 1.0 ou 2.0 mg/kg) a cada 13 semanas, sendo avaliados ao final de 78 semanas. [16] Não se detectaram diferenças estruturais ou no volume ventricular na RMN e o nível de AB40 e AB42 no LCR manteve-se inalterado. [16] Uma análise posterior independente demonstrou uma diminuição do nível cefalorraquidiano de P-Tau e T-Tau no grupo que recebeu o tratamento com Bapineuzumab quando comparados aos níveis medidos antes de iniciar o tratamento. Para P-Tau, houve uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado e o grupo placebo. Estes achados podem indicar que o Bapineuzumab tem efeitos inibitórios no processo neurodegenerativo associado à DA. [2], [12], [14], [19], [29], [30]

Num outro ensaio de fase 2, 28 indivíduos foram avaliados com C-PiB PET. O tratamento com Bapineuzumab durante 78 semanas reduziu significativamente a retenção de C-PiB nas áreas corticais quando comparada com as imagens obtidas antes do tratamento, e com grupo que recebeu placebo. Segundo este estudo, o Bapineuzumab reduziu, ao longo de 78 semanas, a deposição cortical de fibrilas amiloides em 25%. [16], [29]

Nenhum dos ensaios atingiu os objetivos primários que consistiam na demonstração de eficácia cognitiva e funcional com o uso de Bapineuzumab. No entanto, uma análise posterior independente, demonstrou benefícios cognitivos significativos em indivíduos tratados não portadores do alelo APOE $\epsilon$ 4 (um factor de risco major para o desenvolvimento de DA). Tendo em conta esta descoberta, a estruturação dos ensaios de Fase 3 baseou-se na presença ou ausência do alelo APOE $\epsilon$ 4 com o objetivo de avaliar se a presença deste fator de risco alterava a eficácia do Bapineuzumab. [4], [13], [16]

Os ensaios de fase 3 começaram em 2007. Estes estudos multicêntricos, randomizados, duplo-cego, placebo-controlo avaliavam a segurança e eficácia do Bapineuzumab em indivíduos portadores e não portadores do alelo APOE $\epsilon$ 4. [8], [31] Doses variáveis de Bapineuzumab ou placebo, foram administradas intravenosamente a cada 13 semanas durante 78 semanas. [31] As descobertas parecem ser concordantes com as do ensaio de Fase 2, embora estes estudos não tenham sugerido benefício cognitivo nos sujeitos não portadores do alelo APOE $\epsilon$ 4. [2], [8], [28], [31], [32]

Em 2012, o laboratório Pfizer, anunciou que os resultados dos ensaios de fase 3 falharam em demonstrar eficácia cognitiva e funcional em pacientes com DA leve a moderada portadores e não portadores do alelo APOE $\epsilon$ 4. [32] Assim, decidiu-se que o estudo do Bapineuzumab seria descontinuado e que os participantes seriam incluídos num estudo de seguimento. [2], [12],[28], [31]-[34]

Em concordância com os ensaios pré-clínicos, o tratamento com Bapineuzumab foi consistentemente associado a edema vasogénico transitório e microhemorragia, especialmente em indivíduos com DA e que possuem um ou dois alelos  $\epsilon$ 4 da APOE. [2], [8], [12], [14], [16], [19], [28]-[35]. Estes efeitos adversos foram mais tarde designados de anormalidades imagiológicas relacionadas com a amiloide (ARIA). As ARIA incluem imagens de RMN consistentes com edema vasogénico e efusão sulcal (ARIA-E) e imagens sugestivas de microhemorragias e deposição de hemossiderina (ARIA-H).[35]

Dois neurorradiologistas reviram, independentemente, a RMN de 262 sujeitos com DA leve a moderada que participaram em dois ensaios de fase 2 e que receberam doses variáveis de Bapineuzumab ou placebo. Os investigadores não sabiam qual o tratamento a que os pacientes tinham sido submetidos, genótipo APOE $\epsilon$ 4 nem a história médica e demográfica. Os pacientes foram incluídos na análise do risco se não tivessem evidência de ARIA na RMN que precedeu o ensaio. A análise das RMN obtidas após a conclusão do estudo mostrou que apenas os indivíduos que receberam Bapineuzumab é que desenvolveram ARIA, que a incidência destas anormalidades era dose-dependente, aumentando à medida que se eleva a dose de Bapineuzumab, e que é superior entre os indivíduos portadores do alelo APOE $\epsilon$ 4, sugerindo uma relação com os depósitos amiloides vasculares. [35]

### 2.3.2. GSK933776

Desenvolvido pelo laboratório GlaxoSmithKline, o GSK933776 é um anticorpo humanizado monoclonal do isotipo IgG1 que se liga a um epitoto linear na região N-terminal do A $\beta$ . [2], [36] Tendo em conta o risco de edema vasogénico associado aos outros anticorpos anti-A $\beta$ , o GSK933776 tem o domínio Fc inativado pela introdução de duas mutações, o que aumenta o seu perfil de segurança. [2], [36], [37]

Quando administrado a ratos transgénicos para a DA, o anticorpo monoclonal que deu origem ao GSK933776, o GSK719556A diminuiu o conteúdo cerebral de A $\beta$ . Assim, colocou-se a hipótese que o tratamento de sujeitos com DA com GSK933776 poderia resultar na clearance da amiloide solúvel cerebral, reduzindo os seus efeitos neurotóxicos e, em última análise, resultando na prevenção ou retardo substancial da progressão clínica da doença. [36]

Entre Março de 2007 e Maio de 2011, realizou-se um ensaio clínico de fase 1/2a multicêntrico, randomizado, duplo-cego, placebo-controlo para avaliar a segurança, a tolerabilidade, a imunogenicidade, a farmacodinâmica e a farmacocinética da infusão IV de GSK933776 em indivíduos com DA. [37], [38] O estudo foi dividido em duas partes. A parte A avaliava os efeitos de uma dose única crescente, enquanto que a parte B testava a infusão repetida de um dose crescente de GSK933776. [37], [38] Na parte A, os indivíduos receberam dose crescente de GSK933776 ou placebo (0.001, 0.01 e 0.1 mg/Kg). Dose superior só era administrada quando os dados sobre a dose anterior acabassem de ser analisados, ou seja, cerca de 3 semanas após a última dose. Na parte B, os indivíduos foram divididos em quatro grupos experimentais, ou seja, recebiam infusões repetidas de 0.1, 1, 3 ou 6 mg/Kg de GSK933776 ou placebo. [37], [38] Um total de 44 indivíduos participaram no estudo, dos quais 33 foram expostos ao GSK933776. Seis dos indivíduos que participaram na parte A também participaram na parte B. [38]

Em relação à segurança do GSK933776, foram reportados dois efeitos adversos após a sua administração, gota e ataque isquémico transitório, nenhum dos dois foi relacionado com a droga. Nenhuma alteração significativa foi evidente no electrocardiograma, nos sinais vitais ou nas análises laboratoriais de pacientes com DA que receberam GSK933776. Na RMN foi detectada uma hemorragia *de novo* embora não fossem observados sinais de edema vasogénico ou alterações estruturais do cérebro. [38] Anticorpos anti-GSK933776 foram detectados em dois sujeitos. Um destes foi identificado como neutralizante. [38]

Mostrou-se que o GSK933766 tem uma meia vida plasmática de 10 a 15 dias e que a clearance é proporcional à dose administrada (clearance estimada de 0.272 ml/h/kg para as doses de 0.1 mg/kg e de 0.132 ml/h/kg para doses iguais ou superiores a 1 mg/kg). Apenas 2 dos 4 sujeitos que receberam 1 mg/kg, 5 dos 6 indivíduos que receberam 3 mg/kg e todos os que

receberam 6 mg/kg de GSK933776 tiveram concentrações detectáveis deste anticorpo no LCR. [38]

A detecção de sinais de eficácia era improvável face ao pequeno tamanho da amostra baseada na viabilidade e curta duração do tratamento. [38] Houve um aumento dependente da dose nos níveis plasmáticos totais de AB e uma diminuição dependente da dose nos níveis de AB livre, os quais começaram imediatamente após a administração de GSK933776. No LCR houve um aumento nos níveis basais de AB1-38 nos sujeitos tratados GSK933776 quando comparados aos que receberam placebo. Não houve mudanças aparentes nos níveis cefalorraquidianos de tau e p-tau tanto nos indivíduos tratados como nos sujeitos que receberam placebo. [38]

O laboratório GlaxoSmithKline, desenvolveu entre Maio de 2010 e Dezembro de 2011, um ensaio aberto de fase 1 para avaliar, a curto prazo, a segurança e a farmacodinâmica da administração IV de GSK933776 em indivíduos com MCI e DA leve. Um total de 19 sujeitos foram divididos em 3 coortes. A primeira recebeu 1 mg/kg de GSK933776, a segunda recebeu 0.1 ou 3 mg/kg de GSK933776 enquanto que a terceira recebeu 3 ou 6 mg/kg de GSK933776. Os resultados deste estudo, nunca chegaram a ser publicados. [39]

O desenvolvimento deste anticorpo foi descontinuado após a conclusão de ambos os ensaios de fase 1, em 2011, não sendo divulgada a razão. [2]

### **2.3.3. Solanezumab**

Em 2001 DeMattos e colegas reportaram a existência de um anticorpo monoclonal, o m266, que quando administrado em ratos transgênicos, se ligava preferencialmente às formas solúveis de AB, diminuindo os depósitos cerebrais de AB e aumentando consequentemente os níveis plasmáticos de AB. Este achado sugeria que o m266 promoviam a passagem do AB do cérebro para o sangue. Uma única injeção de anticorpo monoclonal m266, era capaz de, em poucos dias, melhorar a função cognitiva destes animais. [12], [13], [16], [19], [28], [40], [41] O anticorpo m266 parece ser mais potente que o 3D6 (precursor do Bapineuzumab) talvez pela ligação preferencial às formas solúveis de AB. [16]

O anticorpo monoclonal m266 é o precursor da Solanezumab, um anticorpo monoclonal humanizado desenvolvido pelos laboratórios Lilly. [2], [4], [12], [14]-[16], [40], [41]

Em 2008, Eli Lilly reportaram que o ensaio clínico multicêntrico, randomizado, duplo cego, placebo controlo de fase 2 de 12 semanas, atingiu com sucesso os objectivos de segurança e tolerabilidade. [4], [13], [16] Neste estudo, o Solanezumab foi administrado a 52 indivíduos portadores de DA leve a moderada em doses até 400 mg por semana. [13] Cerca de 0.1% dos anticorpos foram administrados detectados no LCR. [16] Nenhum dos 42 pacientes tratados

com Solanezumab mostrou qualquer evidência de edema vasogénico, microhemorragias ou inflamação, no entanto, 4 pacientes mostraram títulos de anticorpos anti-Solanezumab, apesar destes não parecerem ser anticorpos neutralizantes. [16] Os níveis de A $\beta$  solúvel estavam significativamente elevados no plasma e no LCR dos indivíduos que receberam Solanezumab. Nenhuma alteração foi detectada nos níveis cefalorraquidianos de tau. [13], [16] Interessantemente, os níveis de A $\beta$ 42 livre no LCR subiram à medida que as doses de anticorpo foram aumentadas, sugerindo a crescente eliminação do A $\beta$ 42 ligado às placas amiloides cerebrais. Adicionalmente, espécies N-truncadas de A $\beta$  foram detectadas no sangue de pacientes a seguir, e não antes da imunização passiva, refletindo o sequestro periférico de A $\beta$  cerebral. [13], [16] Apesar do avaliação primária do estudo não reportar alteração da função cognitiva entre os indivíduos imunizados e os que receberam placebo, a análise dos resultados do subgrupo que apresentava DA leve, mostrou um declínio cognitivo 1/3 mais lento do que normalmente ocorre. [13], [14]

Os ensaios EXPEDITION, decorreram entre Maio de 2009 e Junho de 2012 e consistiram em dois estudos de fase 3, duplo-cegos, placebo-controlo em que se testou o Solanezumab em indivíduos, de 16 países, com DA leve a moderada. [13], [40]-[42] O design do estudo EXPEDITION 1 e EXPEDITION 2 era o mesmo. No total, 1012 indivíduos participaram no estudo EXPEDITION 1 e 1040 participaram no EXPEDITION 2. Os pacientes recebiam 400 mg IV de Solanezumab ou 400 mg IV de placebo a cada 4 semanas ao longo de 18 meses. Ambos os estudos permitiram que os pacientes mantivessem o regime terapêutico pré-estabelecido, assim, mais de 85% destes pacientes continuou a ser medicado com Inibidores de acetilcolinesterase e/ou Memantina. [28], [40]-[42]

Ambos os estudos falharam em demonstrar efeitos benéficos na performance cognitiva e/ou funcional em indivíduos com DA leve a moderada tratados com Solanezumab. [2], [28], [34], [40]-[43] No entanto, uma análise posterior independente, revelou um retardo de 34% no declínio cognitivo nos sujeitos com DA leve tratados com Solanezumab. Ao longo dos 18 meses dos estudos EXPEDITION, a diferença entre os pacientes tratados com Solanezumab versus placebo cresceu a uma taxa relativamente constante. [2], [12], [28], [34], [40], [42], [43] Não foram observadas mudanças nos biomarcadores da DA (nível cefalorraquidiano da proteína Tau e p-Tau, volume hipocampal ou cerebral total e deposição cerebral de amiloide). [2] Os níveis plasmáticos de A $\beta$  mostraram-se aumentados nos indivíduos imunizados. [12], [34]

A incidência de efeitos adversos (mais de 1%), foi estatisticamente mais significativa no grupo imunizado do que no placebo. No estudo EXPEDITION 1 foram observados, principalmente, casos de letargia, rash e indisposição enquanto que no estudo EXPEDITION 2 foram observados casos de angina. [12], [42] Como não age diretamente contra as placas de amiloide fibrilar, o Solanezumab foi pouco associado ao edema vasogénico e às microhemorragias. A incidência de ARIA-E não foi estatisticamente significativa

(aproximadamente 1%), ocorrendo em 11 dos pacientes tratados com Solanezumab e 5 pacientes que receberam placebo. [12], [34], [40], [41]

O ensaio EXPEDITION EXT, a decorrer atualmente, pretende avaliar a segurança e a eficácia do Solanezumab a longo prazo, monitorizando os indivíduos que participaram nos ensaios EXPEDITION 1 e EXPEDITION 2. [44]

O estudo EXPEDITION 3 encontra-se em fase de recrutamento. Este estudo multicêntrico, randomizado, duplo cego, placebo controlo pretende determinar se o Solanezumab atrasa o declínio cognitivo e funcional de indivíduos com DA leve. Um total de 2100 sujeitos serão randomicamente distribuídos para receber 400 mg de Solanezumab ou placebo a cada 4 semanas, durante 18 meses. Estima-se a conclusão deste estudo em Dezembro de 2016. [28], [45], [46]

A sua relativa segurança assim como os sinais de eficácia em pacientes com DA leve podem ser a razão pela qual o Solanezumab foi selecionado para ser testado em dois ensaios preventivos, o estudo DIAN e o A4. [45], [47]-[49] (Ver Capítulo III, Abordagem Preventiva)

#### **2.3.4. Gantenerumab**

O Gantenerumab é um anticorpo totalmente humano, desenvolvido pelos laboratórios Roche, que se liga com bastante afinidade às placas amiloides cerebrais. [12], [14], [15], [50] O anticorpo liga-se a dois sítios do A $\beta$ , um na região N-terminal e outro na região medial. [12], [15]

Foi conduzido um ensaio de fase 1, multicêntrico, randomizado, duplo-cego, placebo-controlo em indivíduos com DA leve a moderada que pretendia não só investigar se a infusão IV de doses ascendentes Gantenerumab conduzia a redução mensurável dos níveis cerebrais de A $\beta$  assim como elucidar o mecanismo, pelo qual, produz tais efeitos. [51], [52] Dezassexis pacientes foram divididos em 2 grupos experimentais, um recebeu duas e o outro recebeu sete infusões IV de Gantenerumab (60 ou 200 mg) ou placebo a cada 4 semanas. Os níveis cerebrais de amiloide foram avaliados pela comparação de imagens C-PiB PET obtidas antes e após o tratamento com Gantenerumab enquanto que o mecanismo de ação foi investigado pela incubação de cortes cerebrais de pacientes com DA foram com doses crescentes de Gantenerumab e células microgliais humanas.

O estudo *in vivo* determinou uma redução média do amiloide cerebral de 15.6% nos indivíduos que receberam 60 mg de Gantenerumab e de 35.7% no grupo que recebeu 200 mg quando comparados com o grupo placebo. [2], [14], [15], [50]-[52] O estudo *ex vivo* mostrou que o Gantenerumab induzia fagocitose das placas amiloides de uma forma dependente da dose.

[51], [53] Os resultados no grupo placebo suportam a deposição cerebral contínua de amiloide em muitos pacientes com DA leve a moderada. [52]

Dois dos sujeitos que receberam a dose mais alta de Gantenerumab (200 mg/kg), demonstraram sinais de edema vasogénico na RMN cerebral. [2], [15], [51], [52] Ambos os pacientes desenvolveram microhemorragias, e um deles era ligeiramente sintomático com cefaleias, tontura, desequilíbrio e tremor. Estes efeitos adversos resolveram-se espontaneamente depois da descontinuação das doses, de forma similar à observada depois do tratamento com Bapineuzumab. [52]

O laboratório Roche recrutou 360 indivíduos para um estudo de fase 2 multicêntrico, randomizado, duplo-cego, placebo-controlo com o objectivo de investigar a eficácia, em termos de performance cognitiva e funcional, e a segurança da infusão subcutânea de Gantenerumab em sujeitos com DA prodrómica ou leve. [15], [52] Os resultados deste estudo não foram ainda publicados.

Atualmente, o laboratório Roche está a recrutar 28 indivíduos japoneses com DA leve a moderada para participar num estudo randomizado, duplo cego, placebo-controlo de fase 1 que pretende testar a segurança, tolerabilidade e farmacocinética de doses múltiplas ascendentes de Gantenerumab. [53]

Um ensaio de multicêntrico, randomizado, duplo cego, placebo-controlo de fase 3 está a decorrer e estima-se que seja concluído em Fevereiro de 2018. Este estudo pretende avaliar a eficácia, segurança, farmacocinética e farmacodinâmica da infusão subcutânea de Gantenerumab em sujeitos com DA prodrómica, ou seja, indivíduos que já apresentam imagens PET positivas para depósitos amiloides mas ainda se apresentam cognitivamente normais. [2], [12], [54] Estão a ser recrutados indivíduos com DA leve para participarem num ensaio, com estrutura similar ao anterior. Prevê-se que este seja concluído em Julho de 2018. [55]

O Gantenerumab está também a ser testado no estudo preventivo DIAN (Dominantly Inherited Alzheimer's network) [15], [47], [48], [56](Ver Capítulo III, Abordagem Preventiva)

### **2.3.5. Crenezumab**

O Crenezumab é um anticorpo monoclonal humanizado do isotipo IgG4, desenvolvido pelo laboratório AC Immune e adquirido pelo Genentech em 2006, que deriva da imunização de ratos com um péptido Aβ1-15 modificado. [2], [12], [14], [15], [57] O isotipo IgG4 conduz a uma menor resposta imune efetora, ou seja, une-se com baixa afinidade aos receptores Fc nos leucócitos e desta forma, tem baixa probabilidade de induzir uma resposta imune inflamatória. [2], [12], [14], [15], [57]

O Crenezumab liga-se tanto a formas monoméricas como oligoméricas de A $\beta$ , inibindo a sua agregação e promovendo a sua desagregação. [2], [12], [15], [57]

Para avaliar o perfil de segurança, o Crenezumab foi testado num ensaio clínico de fase 1 randomizado, duplo-cego, placebo-controlo com dose única crescente seguido de doses múltiplas em indivíduos com DA leve a moderada. Este estudo conclui que o tratamento com Crenezumab é seguro, não mostrando sinais de microhemorragias ou edema vasogénico cerebral, mesmo em portadores do alelo APOE $\epsilon$ 4. [2], [12], [14], [57] A análise farmacocinética e farmacodinâmica demonstraram um aumento dose-dependente dos níveis plasmáticos totais de A $\beta$ . [57]

Atualmente, um ensaio aberto de fase 2, está a recrutar participantes. Este estudo pretende avaliar a segurança e tolerabilidade, a longo prazo, da administração de Crenezumab em pacientes com DA leve a moderada. Estima-se que este estudo esteja concluído em Maio de 2016 [2], [12], [58]

O Crenezumab também foi selecionado para ser aplicado no ensaio preventivo API (Alzheimer's Preventive Initiative) que está, atualmente em fase de recrutamento. (ver capítulo III, Abordagem Preventiva) [12], [15], [59]

### **2.3.6. Ponezumab**

O Ponezumab, é um anticorpo monoclonal humanizado do isotipo IgG2, que se liga especificamente à região C-terminal do A $\beta$ 40. [60], [61]

A administração de Ponezumab a ratos transgénicos que sobre-expressam A $\beta$  concluiu que este anticorpo liga-se aos depósitos cerebrais de A $\beta$ , induzindo uma redução, dependente da dose, das placas amiloides presentes no hipocampo e um aumento consideravelmente os níveis plasmáticos de A $\beta$ 40. A incidência de microhemorragia no grupo imunizado foi igual ou superior à do grupo controlo. Não houve sinais de edema vasogénico. [60]

Dois ensaio randomizados, duplo cego, placebo-controlo de fase 1 testaram a infusão IV de dose única crescente de Ponezumab, por 2 horas ou 10 minutos, em indivíduos com DA leve a moderada. O objectivo era avaliar a segurança, farmacocinética e farmacodinâmica do fármaco. Foram colhidas amostras de LCR, no início do estudo e ao dia 29. Os sujeitos foram seguidos durante 1 ano. [61]-[63] Em ambos os estudos, a infusão IV de Ponezumab mostrou-se segura e bem tolerada não havendo evidência de microhemorragia, edema vasogénico, encefalite ou outra anormalidade imagiológica, nem tampouco, alterações electrocardiográficas ou laboratoriais. [61]-[63] Na infusão durante 2 horas não foram detectados efeitos adversos sérios e os efeitos secundários mais comuns, todos de intensidade leve a moderada, foram infecção do trato respiratório superior, cefaleia e lombalgia. [62]

Durante a infusão por 10 minutos não se verificaram mortes, desistências ou efeitos adversos moderados, severos ou sérios associados à droga. Efeitos adversos leves associados ao fármaco incluíram, cefaleia, letargia e hipoestesia. [63] A meia vida plasmática do Ponezumab foi de aproximadamente 6 semanas. Alguns dos indivíduos que receberam dose mais alta, tinham concentrações cefalorraquidianas detectáveis de Ponezumab ao fim de 29 dias. A concentração plasmática de A $\beta$  aumentou de uma forma dose-dependente. Estes resultados sugerem que a administração IV de Ponezumab altera o A $\beta$  cerebral. [61]-[63]

Segundo o site [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov), outros ensaios randomizados, duplo cego, placebo-controlo de fase 1 foram concluídos, para avaliar a segurança e tolerabilidade da administração de doses únicas de Ponezumab em indivíduos com DA leve a moderada. Para além disso, também foram conduzidos 2 ensaios de fase 2 para determinar a segurança, tolerabilidade, farmacocinética e farmacodinâmica da administração de múltiplas doses de Ponezumab a sujeitos com DA leve a moderada. Os resultados destes ensaios não foram divulgados até à data.

### **2.3.7. BAN2401**

Nos últimos anos, tem havido um interesse crescente nos oligómeros de A $\beta$ , em detrimento das placas amiloides, como alvo terapêutico na DA. No final da década de 90, a mutação Arctic, que conduz inexoravelmente a DA, foi descoberta numa família sueca. Estudos subsequentes concluíram esta mutação leva à geração de oligómeros longos e tóxicos de A $\beta$ , as protofibrilas. O anticorpo monoclonal BAN2401, desenvolvido pelo laboratório Eisai Inc., reconhece esta espécie de A $\beta$  [2], [12], [15] O tratamento de ratos transgénicos para a mutação Arctic com BAN2401 reduziu os níveis de protofibrilas solúveis de A $\beta$ . Quando o tratamento foi iniciado antes da deposição de placas amiloides, o A $\beta$  não foi capaz de formar fibrilhas. [2], [15]

Em 2010, realizou-se um ensaio clínico de fase 1/2a em 80 indivíduos com DA leve a moderada para avaliar a segurança e tolerabilidade da administração de doses ascendentes de BAN2401. Os indivíduos foram randomicamente distribuídos para receber BAN2401 ou placebo até uma dose máxima de 15 mg/kg. Não foram observados efeitos adversos graves, sendo considerado seguro e bem tolerado.[15]

Segundo o site [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov), dois ensaios clínicos estão neste momento a recrutar participantes. O primeiro com conclusão prevista para Dezembro de 2014, é um ensaio, randomizado, duplo-cego, placebo-controlo que pretende avaliar a segurança, tolerabilidade, farmacocinética, farmacodinâmica e imunogenicidade de doses IV repetidas de BAN2401 em sujeitos com MCI ou DA leve. O outro, consiste num ensaio de fase 2 randomizado, duplo-cego, placebo-controlo que tem como objectivo determinar dose ideal BAN2401 para obter a

máxima eficácia em pacientes com DA leve. Estima-se que este último ensaio seja concluído em Outubro de 2016.

### **2.3.8. BIIB037**

O laboratório Biogen Indec desenvolveu um anticorpo monoclonal humano do isotipo IgG1 gerado a partir de anticorpos endógenos colhidos de um indivíduo com DA e evolução clínica anormalmente estável. [2], [12], [15], [64], [65] Este anticorpo apresenta alta afinidade para fibrilas AB insolúveis, possuindo afinidade 100 vezes inferior para monómeros de AB e para a amiloide vascular. [2], [12]

A infusão de BIIB037 em ratos transgênicos para APP mostrou reduzir os depósitos de AB aumentando, conseqüentemente, os níveis de AB no LCR. [2], [64], [65]

Em 2011, o laboratório Biogen Indec começou um ensaio randomizado, duplo-cego, placebo-controlo de fase 1 nos EUA, para avaliar a segurança, tolerabilidade e farmacocinética de uma dose IV única ascendente de BIIB037 em pacientes com DA leve a moderada. Um total de 48 indivíduos com idade compreendida entre os 55 e os 88 anos participaram no ensaio. [64] Os resultados finais não foram divulgados, mas sabe-se que a vacina mostrou-se segura e foi tolerada. [12]

Atualmente, estão a ser recrutados 160 indivíduos para participarem num estudo randomizado, duplo-cego, placebo-controlo de fase 1 nos EUA, para avaliar a segurança, tolerabilidade e farmacocinética da administração IV de múltiplas doses de BIIB037 em pacientes com DA leve ou prodrómica. A sua conclusão está prevista para Abril de 2016. [65]

### **2.3.9. Imunoglobulinas Intravenosas**

Uma forma ligeiramente diferente de imunização passiva consiste na injeção de concentrados de imunoglobulina (IGIV) de pessoas saudáveis em pacientes com DA. As IGIV parecem inibir os agregados solúveis de AB. [2], [13], [14], [66]

Esta abordagem baseou-se em 3 factos: primeiro, os preparados de IGIV contêm anticorpos policlonais de ocorrência natural que reconhecem e bloqueiam especificamente a toxicidade do AB; segundo, esses anticorpos estão reduzidos nos indivíduos com a DA; e por último os pacientes tratados regularmente com estes preparados (imunossupressão ou autoimunidade), tem risco 40% inferior de desenvolver DA. [2], [14], [66]

Em estudos pré-clínicos, os anticorpos policlonais da IGIV mostraram interferir com a oligomerização e fibrilação de AB, proteger os neurónios contra a toxicidade mediada pelas espécies de AB e promover a eliminação cerebral de AB.[13]

O tratamento com IGIV de indivíduos com DA foi relatado pela primeira vez em 2004, num ensaio de fase 1, desenvolvido por Dodel e colegas. Cinco pacientes com DA leve a moderada (pontuação média no MMSE de 19.4) receberam 0.4 g/kg de Octagam por 3 dias sucessivos, a cada 4 semanas, num total de 6 meses. O objectivo primário deste ensaio foi avaliar a segurança de infusões repetidas de IGIV em indivíduos idosos com DA e examinar os níveis plasmáticos e cefalorraquidianos dos anticorpos anti-AB em função da dose administrada de IGIV. [66], [67] O tratamento destes pacientes com IVIG foi associado a um aumento significativo nos níveis plasmáticos de AB40, a uma diminuição significativa dos níveis de AB40 no LCR assim como a uma melhoria na função cognitiva em 4 dos 5 pacientes tratados com IGIV. [66]-[68]

Em 2009, Relkin, publicou os resultados de um ensaio clínico aberto de fase 1, no qual 8 indivíduos com DA leve (pontuação média no MMSE de 23.5) receberam Gammagard durante 6 meses, fizeram uma pausa de 3 meses e reiniciaram IGIV por mais 9 meses. Após 6 meses de tratamento os resultados médios no MMSE aumentaram para 26.0 pontos, refletindo o aumento da pontuação em 6 indivíduos e a inalteração da pontuação em 2 indivíduos tratados com IGIV. Após a interrupção do tratamento por 3 meses, o resultado médio no MMSE voltou aos níveis basais (23.9). Após o tratamento adicional por 9 meses, os resultados médios do MMSE permaneceram sensivelmente inalterados (24.0). [13], [14], [66]-[68] Adicionalmente, os anticorpos anti-AB foram detectados no LCR após o tratamento com IGIV, indicando que estes podem atravessar a BHE e baixar os níveis de AB dentro do cérebro. [13], [14]

Em 2006, antes dos resultados dos dois estudos anteriores serem publicados, Baxter iniciou um ensaio clínico de fase 2 duplo-cego com o Gammagard. Foram observados melhores resultados aos 3, 6 e 9 meses nos grupos tratados com Gammagard do que nos tratados com placebo. Os quatro pacientes que foram incluídos no esquema com 0.4 g/kg de Gammagard a cada 2 semanas, num total de 36 meses, não mostraram evidências de progressão do declínio cognitivo ou da memória. [67], [68]

Os resultados do ensaio de fase 2 de 24 semanas, duplo cego, placebo-controlo com Octagam foram publicados em Janeiro de 2013. O Octagam não aparentou ter efeitos nos resultados cognitivos e funcionais de pacientes com DA tratados. Não foram reportados aumentos plasmáticos de AB40, observados nos ensaios de fase 1 e que sugeriam que a IGIV poderiam aumentar o efluxo de AB do cérebro. A única observação favorável, foi um aumento do metabolismo da glicose em algumas regiões cerebrais (mesmo assim, reduzido em relação aos indivíduos saudáveis) nos indivíduos tratados com Octagam, apesar do seu significado clínico ser incerto. [67], [68]

Em Maio de 2013, os resultados de um ensaio de fase 2, placebo-controlo, acerca do tratamento de indivíduos com DA com Gammagard foram anunciados. Trezentos e noventa pacientes foram tratados a cada 2 semanas por 18 meses com 200 mg/kg de Gammagard, 400

mg/kg de Gammagard ou placebo. Não foram observadas diferenças significativas na taxa de declínio cognitivo entre os indivíduos que receberam Gammagard e os que receberam placebo.

O tratamento com IVIG foi associado a potenciais eventos tromboembólicos, disfunção renal e déficits hematológicos. [67]

Atualmente, 50 indivíduos estão a participar num pequeno estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego, placebo controlado, de fase 2, desenvolvido pelo laboratório Sutter Health Corporation. O objectivo deste estudo é avaliar o efeito do NewGam em pacientes com a forma amnésica do distúrbio cognitivo mínimo (MCIa) e a sua influência no risco destes indivíduos desenvolverem DA. A conclusão está prevista para Outubro de 2014. [12], [66], [67], [69]

O laboratório Grifols Biologicals, Inc está neste momento a recrutar 350 indivíduos com DA de leve a moderada, para testar o tratamento com Flebogamma, que consiste numa preparação de albumina e IGIV. [12], [66], [67], [70]. Este estudo pretende determinar se a plasmaferese com a infusão combinada de albumina e IGIV é capaz de modificar a performance cognitiva, funcional, comportamental e global dos pacientes com DA. Estima-se a conclusão do ensaio em Dezembro de 2016. [70]

## 2.4. Abordagem Preventiva

Num estudo longitudinal publicado recentemente, descobriu-se que os níveis de AB42 no LCR começam a diminuir 25 anos antes do aparecimento dos sintomas clínicos, marcando o começo da deposição de AB no cérebro. Estudos com C-PiB PET (marcador específico das espécies fibrilares de AB) sugerem que a deposição de AB é já visível 15 anos antes do começo dos sintomas. [17]

Esta observação aliada aos resultados desapontantes dos ensaios clínicos sugerem que a imunoterapia possa estar a ser aplicada demasiado tarde na evolução da DA, devendo ser iniciada antes dos sintomas se tornarem aparentes. [17], [71], [72]

Infelizmente, as estratégias preventivas requerem a participação de imensas pessoas saudáveis, o gasto de enormes quantias de dinheiro e demasiado tempo para avaliar se o tratamento pré-sintomático atinge os seus objectivos primários. Acredita-se que a neuroimagem e outros biomarcadores, são necessários para avaliar rapidamente os tratamentos pré-sintomáticos sem ter de estudar centenas de voluntários saudáveis e esperar vários anos para poder caracterizar ou comparar os resultados entre o grupo tratado e o grupo placebo. [72]

Para estabelecer o período ideal em que o tratamento deve começar para ter máxima eficácia na prevenção da DA, três novos ensaios clínicos foram desenhados, o DIAN, o API e o A4. [17]

### 2.4.1. Dominantly Inherited Alzheimer Network

O estudo *Dominantly Inherited Alzheimer Network* (DIAN) pretende avaliar a aplicação de três métodos terapêuticos em pacientes que possuem mutações genéticas, ou seja, indivíduos geneticamente determinados a desenvolver uma forma rara e agressiva de DA que surge numa idade precoce. [14], [40], [47], [48], [73] Este estudo pretende envolver um total de 160 indivíduos, 80 portadores de mutações autossómicas dominantes e 80 não portadores de mutações. [28], [47], [48]

Dos 3 medicamentos seleccionados, 2 deles são os anticorpos monoclonais anti-AB, o Solanezumab e o Gantenerumab, enquanto o terceiro consiste num inibidor de  $\beta$ -secretase (BACE), o qual também induz a redução dos depósitos de AB ao bloquear a enzima envolvida no processamento da ABPP. [12], [14], [40], [47], [48] (Ver Capítulo III, Abordagem Passiva)

### 2.4.2. Alzheimer's Preventive Initiative

O estudo randomizado, duplo cego, placebo-controlo *Alzheimer's Preventive Initiative* (API) testará a eficácia do Crenezumab em membros da maior família portadora de mutação autossômica dominante no gene PS-1, responsável pelo desenvolvimento inevitável de DAF, por volta dos 50 anos de idade. [7], [8], [12], [14], [17], [59], [72] (Ver Capítulo III, Abordagem Passiva) Esta família é constituída por cerca de 5 000 pessoas incluindo um número suficiente de portadores pré-sintomáticos, com idade igual ou superior a 30 anos, tornando possível relacionar os efeitos terapêuticos num período de 2 a 5 anos. [7], [72]

Neste estudo, foram executados testes genéticos para determinar quais os portadores e os não portadores da mutação. Os portadores da mutação PS1 serão randomicamente distribuídos para receber Crenezumab ou placebo enquanto os não portadores receberão placebo. [7], [71], [72] Um total de 300 pessoas assintomáticas participarão no ensaio, das quais, dois terços são portadoras de mutação. [7], [8], [12], [14], [17], [59], [71], [72] Ao longo do estudo, os biomarcadores da doença serão avaliados, o que inclui o estudo neuroimagiológico, a análise do LCR e plasma e estudos cognitivos. [7], [72]

Recentemente, foram incluídos neste estudo, 24 indivíduos norte americanos assintomáticos, portadores da mutação PS1 ou homozigóticos para o alelo APOEε4. [71], [72]

Se após os 2 anos de estudo, o tratamento não produzir os efeitos expectáveis num ou mais biomarcadores, o estudo vai ser considerado um fracasso e será interrompido, permitindo que os indivíduos participem noutros ensaios promissores. Se, pelo contrário, o tratamento alterar os marcadores, o estudo continuará para avaliar o efeitos na performance cognitiva. [72]

### 2.4.3. Anti-Amyloid Treatment for Assymptomatic Alzheimer's Disease

O estudo multicêntrico, randomizado, duplo cego, placebo controlo, *Anti-Amyloid Treatment for Assymptomatic Alzheimer's Disease* (A4) vai testar o Solanezumab em 1000 indivíduos idosos assintomáticos, não portadores de mutações autossômicas dominantes, mas que possuem deposição cerebral de AB observada na C-PiB PET. [7], [12], [14], [49], [71] O objetivo deste estudo é verificar se o tratamento precoce, antes do inicio da sintomatologia clínica, consegue bloquear a deposição adicional de AB no cérebro destes sujeitos consequentemente atrasar ou mesmo evitar o inicio clínico da DA. [14], [49]

De acordo com os investigadores, um terço dos indivíduos idosos “cl clinicamente normais” tem depósitos cerebrais de AB. Estes indivíduos AB positivos “cl clinicamente normais” tem evidências de anormalidades na PET e RMN cerebral, elevação dos níveis cefalorraquidianos de tau e deficits cognitivos subtis consistentes com os estágios pré-clínicos da DA, o que os torna numa amostra ideal para tentar atrasar ou mesmo prevenir o declínio cognitivo. [71]

## Capítulo III. Conclusões Finais

A geração de A $\beta$  requer duas clivagens específicas e sequências da proteína transmembranar A $\beta$ PP: a primeira, no domínio extracelular, pela  $\beta$ -secretase (*processamento amiloidogénico*) e a segunda, transmembranar, pela  $\gamma$ -secretase. O facto de a  $\gamma$ -secretase poder atuar em diferentes sítios do domínio transmembranar resulta em péptidos A $\beta$  de diferentes comprimentos. As formas mais abundantes no cérebro são o A $\beta$ 40 e o A $\beta$ 42 (razão A $\beta$ 40 para A $\beta$ 42 de 0.1). No entanto, as formas mais longas de A $\beta$ , como o A $\beta$ 42, têm mais tendência para oligomerizar e exibem propriedades neurotóxicas mais acentuadas.

Comparando o LCR de indivíduos saudáveis com o de indivíduos portadores de DA é possível verificar que os níveis de A $\beta$ 42 são inferiores na presença de DA enquanto os níveis de A $\beta$ 40 são semelhantes entre as duas populações. Demonstrou-se não só uma relação inversa entre os níveis cefalorraquidianos baixos de A $\beta$  e a AAC e a deposição de placas amiloides, como uma diminuição da razão entre a quantidade de A $\beta$  cerebral e o número placas amiloides, tanto em indivíduos saudáveis como em portadores da DA, à medida que a idade avança. Em ambas as situações, a diminuição foi mais pronunciada nos níveis de A $\beta$ 42, consistentemente com a expressão preferencial de A $\beta$ 42 nas placas amiloides.

Como no LCR, os níveis plasmáticos de A $\beta$ 40 foram superiores aos de A $\beta$ 42. O aumento associado à idade nos níveis plasmáticos de A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 contrastam com a diminuição dos mesmos no LCR. Após a separação cromatográfica das proteínas plasmáticas é possível observar uma semelhança na concentração total de A $\beta$  no LCR e no plasma o que é consistente com o equilíbrio mantido por diversos sistemas de transporte ativo ao longo da BHE.

O papel do A $\beta$  na DA continua incerto. Vários estudos sugerem que a A $\beta$  pode promover a neurodegeneração ao induzir inflamação, danificar as membranas celulares e as células microgliais e ao alterar a homeostasia celular do cálcio. Para além disso, um estudo indica que o amiloide, tendo características bioquímicas parecidas com as geradas pela cascata de coagulação, pode ter um papel na proteção e reparação da microvasculatura cerebral, e que é a sua produção e deposição em excesso, que restringe o lúmen do vaso e resulta na diminuição da perfusão sanguínea cerebral, promovendo a disfunção e morte neuronal.

A hipótese da cascata amiloide, defende que a DA consiste num processo contínuo que começa com acumulação, agregação e deposição de A $\beta$  no cérebro o que desencadeia uma cascata neurodegenerativa complexa que resulta no declínio cognitivo progressivo e demência, característicos da DA. Segundo esta hipótese, a prevenção ou reversão do evento desencadeante pode prevenir ou reverter a fisiopatologia da doença.

Inúmeras técnicas imunoterapêuticas ativas e passivas contra o amiloide têm sido testadas, no sentido de encontrar o fármaco que revolucionaria a abordagem terapêutica, de sintomática para modificadora da doença ou mesmo curativa.

A primeira vacina ativa a ser testada em humanos foi a AN1792, sendo os ensaios clínicos interrompidos em Agosto de 2002, pelo desenvolvimento de meningoencefalite asséptica em 6% dos indivíduos imunizados. Apesar deste efeito adverso, os estudos *follow up* e *pós-mortem* revelaram, consistentemente, que os indivíduos que receberam a vacina tinham: diminuição das placas amiloides, sendo esta redução proporcional aos títulos de anticorpos produzidos; nível cefalorraquidiano de proteína Tau reduzido; declínio cognitivo mais lento do que os controles, embora, todos apresentassem demência severa na altura da morte e uma redução do volume cerebral mais acentuada com estabilização posterior.

Estes resultados foram encorajadores e motivaram o desenvolvimento de uma segunda geração de vacinas ativas que consistiam em derivados do péptido AB que não expressassem o epitoto da célula T, localizado na região C-terminal. Estas vacinas são a ACC-001, a CAD106 e as AFFITOPE. Todas as formulações se mostraram seguras para uso humano, não se observando a ocorrência de meningoencefalite. Até à data, nenhuma dos fármacos demonstrou eficácia terapêutica. Apesar disso, está a decorrer um ensaio de fase 2 com a vacina ACC-001 e outro com a AFFITOPE.

O Bapineuzumab foi o primeiro anticorpo monoclonal a ser testado em humanos. A imunização com Bapineuzumab não alterou a estrutura e o volume cerebral na RMN nem o nível cefalorraquidiano de A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42, embora se tenha detectado redução da captação de C-Pib na PET e uma diminuição de P-tau e T-tau no LCR de indivíduos imunizados. Apesar do efeito farmacodinâmico, todos os ensaios falharam na demonstração de eficácia clínica e a investigação foi descontinuada. Além disso, o tratamento com Bapineuzumab foi consistentemente associado a edema vasogénico transitório e microhemorragia (ARIA), especialmente em indivíduos com DA portadores de um ou dois alelos  $\epsilon$ 4 da APOE.

Vários anticorpos monoclonais foram subsequentemente desenvolvidos para imunoterapia passiva, atuando em diversas espécies de AB. Assim como o Bapineuzumab, todos (cujos resultados foram publicados) foram considerados seguros e bem tolerados, mostraram incidência aumentada, embora em menor grau, de ARIA (exceto o Crenezumab), demonstraram efeitos farmacodinâmicos promissores e falharam em demonstrar eficácia clínica nos indivíduos em diferentes estágios da DA. Apesar destes resultados desapontantes o Solanezumab, o Gantenerumab e o Crenezumab continuam não só a ser testados em ensaios terapêuticos como também foram selecionados para ensaios preventivos. Outros anticorpos em estudo incluem o Ponezumab, o BAN2401 e o BIIB037.

Outra forma de imunização passiva consiste na administração IV de imunoglobulinas. Ensaios mostraram: melhoria da função cognitiva em indivíduos com DA leve a moderada (embora com tendência à regressão quando interrompido o tratamento); aumento do metabolismo em determinadas regiões cerebrais (FDG-PET) e uma estabilização do declínio cognitivo. Embora não tenha sido comprovada eficácia clínica, presentemente estão a decorrer dois ensaios clínicos.

Atualmente, nenhum dos agentes imunoterapêuticos ativos ou passivos foi aprovado para o tratamento da DA continuando este a ser, fundamentalmente, sintomático.

Testar terapias anti-AB em pacientes com DA clínica diagnosticada pode ser comparável a tentar tratar pacientes com aterosclerose, enfarte miocárdico e insuficiência cardíaca com uma estatina e esperar que a função cardíaca e a evolução clínica melhore significativamente. A verdade é que pouco se sabe acerca da patogenia da DA, nem tampouco temos acesso a métodos de avaliação sensíveis e específicos para os estadios precoces ou mesmo tardios da doença. Esta nossa ignorância torna difícil o desenvolvimento de fármacos eficazes e o desenho de ensaios clínicos apropriados que nos conduzam a resultados significativos.

Neste sentido, os estudos preventivos são atualmente, a maior esperança no encontro de terapias modificadoras da doença, possibilitando não só uma maior compreensão da evolução da doença e da sua adequação à hipótese da cascata amiloide, com uma forma de testar utilidade dos biomarcadores para o diagnóstico dos vários estadios da DA.

## Referências Bibliográficas

- [1] D. S. Gelinas, K. DaSilva, D. Fenili, P. St George-Hyslop, and J. McLaurin. Immunotherapy for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 2004; 101 ;14657-14662.
- [2] J. Moreth, C. Mavoungou, and K. Schindowski. Passive anti-amyloid immunotherapy in Alzheimer's disease: What are the most promising targets?. *Immun Ageing*; 2013; 10, 18.
- [3] R. J. Castellani, R. K. Rolston, and M. A. Smith. Alzheimer disease. *Dis Mon*; 2010; 56; 484-546.
- [4] Therapeutic Potential of Vaccines for Alzheimer's Disease. <http://www.medscape.com/viewarticle/739778>.
- [5] M. E. Weksler, G. Gouras, N. R. Relkin, and P. Szabo. The immune system, amyloid-beta peptide, and Alzheimer's disease. *Immunol Rev*; 2005; 205; 244-56.
- [6] D. Galimberti and E. Scarpini. Disease-modifying treatments for Alzheimer's disease. *Ther Adv Neurol Disord*; 2011; 4; 203-216.
- [7] New Alzheimer's Prevention Trial Part of US National Plan. <http://www.medscape.com/viewarticle/764102>.
- [8] A. E. Roher, D. H. Cribbs, R. C. Kim, C. L. Maarouf, C. M. Whiteside, T. a Kokjohn, I. D. Daus, E. Head, C. Liebsack, G. Serrano, C. Belden, M. N. Sabbagh, and T. G. Beach. Bapineuzumab alters a $\beta$  composition: implications for the amyloid cascade hypothesis and anti-amyloid immunotherapy. *PLoS One*; 2013; 8; e59735.
- [9] O. Wirths, G. Multhaup, and T. a Bayer. A modified beta-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the beta-amyloid peptide--the first step of a fatal cascade. *J Neurochem*; 2004; 91; 513-20.
- [10] O. Wirths, G. Multhaup, and T. A. Bayer. A modified B-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the B-amyloid peptide - the first step of a fatal cascade. *J Neurochem*; 2004; 91; 513-520.
- [11] T. E. Golde, L. S. Schneider, and E. H. Koo. Anti-A $\beta$  therapeutics in alzheimer's disease: The need for a paradigm shift. *Neuron*; 2011; 69; 203-213.
- [12] C. a Lemere. Immunotherapy for Alzheimer's disease: hoops and hurdles. *Mol Neurodegener*; 2013; 8, 36.
- [13] C. A. Lemere and E. Masliah. Can Alzheimer disease be prevented by amyloid-B immunotherapy?. *Nature Reviews Neurology*; 2010; 6; 296-296.

- [14] D. Lambracht-Washington and R. N. Rosenberg. Advances in the development of vaccines for Alzheimer's disease. *Discov Med*; 15; 319-26.
- [15] L. Lannfelt, N. R. Relkin, and E. R. Siemers. Amyloid- $\beta$ -directed immunotherapy for Alzheimer's disease. *J Intern Med*; 2014; 275; 284-95.
- [16] D. Schenk, G. S. Basji, and M. N. Pangalos. Treatment strategies targeting amyloid  $\beta$ -protein. *Cold Spring Harb Perspect Med*; 2012; 2; a006387.
- [17] D. Lambracht-Washington and R. N. Rosenberg. Active DNA AB42 vaccination as immunotherapy for Alzheimer disease. *Transl Neurosci*; 2012; 3; 307-313.
- [18] Detectable Anti-AB Titers and Less Function Loss After Immunization AD. <http://www.medscape.com/viewarticle/558159>.
- [19] Y. Hong-Qi, S. Zhi-Kun, and C. Sheng-Di. Current advances in the treatment of Alzheimer's disease: focused on considerations targeting AB and tau. *Transl Neurodegener*; 2012; 1; 21.
- [20] Alzheimer's Vaccine Clears Plaques but Does Not Stop Disease Progression. <http://www.medscape.com/viewarticle/578046>.
- [21] Amyloid Imaging And Safety Study Of ACC-001 In Subjects With Early Alzheimer's Disease. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01227564?term=ACC+001&rank=2>.
- [22] K. Kingwell. Alzheimer disease: Amyloid- $\beta$  immunotherapy CAD106 passes first safety test in patients with Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*; 2012; 8; 414.
- [23] C. Wiessner, K.-H. Wiederhold, A. C. Tissot, P. Frey, S. Danner, L. H. Jacobson, G. T. Jennings, R. Löönd, R. Ortman, J. Reichwald, M. Zurini, A. Mir, M. F. Bachmann, and M. Staufenbiel. The second-generation active AB immunotherapy CAD106 reduces amyloid accumulation in APP transgenic mice while minimizing potential side effects. *J Neurosci*; 2011; 31; 9323-9331.
- [24] B. Winblad, N. Andreasen, L. Minthon, A. Floesser, G. Imbert, T. Dumortier, R. P. Maguire, K. Blennow, J. Lundmark, M. Staufenbiel, J.-M. Orgogozo, and A. Graf. Safety, tolerability, and antibody response of active AB immunotherapy with CAD106 in patients with Alzheimer's disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, first-in-human study. *Lancet Neurol*; 2012; 11; 597-604.
- [25] Safety and Tolerability Study in Patients With Mild to Moderate Alzheimer's Disease (AD). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00411580?term=CAD+106+Alzheimer&rank=6>.
- [26] A. Schneeberger, M. Mandler, O. Ottawa, W. Zauner, F. Mattner, and W. Schmidt. Development of AFFITOPE vaccines for Alzheimer's disease (AD)-- from concept to clinical testing. *J Nutr Health Aging*; 2009; 13; 264-267.
- [27] Follow-up Study to Assess Safety and Clinical Activity of Continued AFFITOPE® AD02 Vaccinations of Patients Who Participated in AFF006.

- <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02008513?term=AFFITOPE+alzheimer&rank=6>.
- [28] The Good News on Anti-amyloid Alzheimer's Therapies.  
<http://www.medscape.com/viewarticle/819600>. [Accessed: 09-Apr-2014].
- [29] Y. Y. Lim, P. Maruff, R. H. Pietrzak, D. Ames, K. a Ellis, K. Harrington, N. T. Lautenschlager, C. Szoek, R. N. Martins, C. L. Masters, V. L. Villemagne, and C. C. Rowe. Effect of amyloid on memory and non-memory decline from preclinical to clinical Alzheimer's disease. *Brain*; 2014; 137; 221-31.
- [30] K. Blennow, H. Zetterberg, J. O. Rinne, S. Salloway, J. Wei, R. Black, M. Grundman, and E. Liu. Effect of Immunotherapy With Bapineuzumab on Cerebrospinal Fluid Biomarker Levels in Patients With Mild to Moderate Alzheimer Disease. *Arch Neurol*; 2012;1-9.
- [31] S. Salloway, R. Sperling, N. C. Fox, K. Blennow, W. Klunk, M. Raskind, M. Sabbagh, L. S. Honig, A. P. Porsteinsson, S. Ferris, M. Reichert, N. Ketter, B. Nejadnik, V. Guenzler, M. Miloslavsky, D. Wang, Y. Lu, J. Lull, I. C. Tudor, E. Liu, M. Grundman, E. Yuen, R. Black, and H. R. Brashear. Two Phase 3 Trials of Bapineuzumab in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*; 2014; 370; 322-33.
- [32] Bapineuzumab Fails in Phase 3 Alzheimer's Trial.  
<http://www.medscape.com/viewarticle/768013>.
- [33] Second Bapineuzumab Trial Fails in Alzheimer's.  
<http://www.medscape.com/viewarticle/768789>.
- [34] H. O. Tayeb, E. D. Murray, B. H. Price, and F. I. Tarazi. Bapineuzumab and solanezumab for Alzheimer's disease: is the 'amyloid cascade hypothesis' still alive?. *Expert Opin Biol Ther*; 2013; 13; 1075-84.
- [35] R. Sperling, S. Salloway, D. J. Brooks, D. Tampieri, J. Barakos, N. C. Fox, M. Raskind, M. Sabbagh, L. S. Honig, A. P. Porsteinsson, I. Lieberburg, H. M. Arrighi, K. A. Morris, Y. Lu, E. Liu, K. M. Gregg, H. R. Brashear, G. G. Kinney, R. Black, and M. Grundman. Amyloid-related imaging abnormalities in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a retrospective analysis. *Lancet Neurol*; 2012; 11; 241-249.
- [36] A randomized, single-blind, placebo-controlled study to investigate the safety, tolerability, immunogenicity, pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous infusion of GSK933776 in patients with Alzheimer's disease. 2011; 1-8.
- [37] A Clinical Study to Assess Single and Repeat Doses of a New Medication (GSK933776) in Patients With Alzheimer's Disease.  
<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00459550?term=gsk933776&rank=3>.
- [38] A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Study to Assess Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, Immunogenicity, and Pharmacodynamic

- Response of Repeated Intravenous Infusions of BAN2401 in Subjects With Mild Cognitive Impairment Due to Alzheimer's .  
<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02094729?term=ban2401+alzheim er&rank=1>.
- [39] Modulation of Abeta Levels by GSK933776 in Alzheimer's Disease Patient .  
<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01424436?term=gsk93377 6&rank=2>.
- [40] More Good News for Solanezumab in Alzheimer's.  
<http://www.medscape.com/viewarticle/773824>.
- [41] R. S. Doody, R. G. Thomas, M. Farlow, T. Iwatsubo, B. Vellas, S. Joffe, K. Kieburtz, R. Raman, X. Sun, P. S. Aisen, E. Siemers, H. Liu-Seifert, and R. Mohs. Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med*; 2014; 370; 311-21.
- [42] P. E. Lilly and C. Nyse. Eli Lilly and Company Announces Top-Line Results on Solanezumab Phase 3 Clinical Trials in Patients with Alzheimer ' s Disease. 2012; 1; 3-4.
- [43] E. Lilly press release. Lilly Announces Detailed Results of the Phase 3 Solanezumab EXPEDITION Studies Following a Presentation of the Independent Analyses by the Alzheimer ' s Disease Cooperative Study ( ADCS ); 2012; 3-5.
- [44] Continued Safety Monitoring of Solanezumab in Alzheimer's Disease (EXPEDITION EXT).  
<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01127633?term=solanezumab+alz heimer&rank=4>.
- [45] E. Lilly, B. L. Application, D. C. Study, and C. Trial. Lilly Provides Update on Next Steps for Solanezumab. 2013; 34-35.
- [46] Progress of Mild Alzheimer's Disease in Participants on Solanezumab Versus Placebo.  
<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01900665?term=solanezumab+alz heimer&rank=1>.
- [47] Dominantly Inherited Alzheimer Network Trial: An Opportunity to Prevent Dementia. A Study of Potential Disease Modifying Treatments in Individuals at Risk for or With a Type of Early Onset Alzheimer's Disease Caused by a Genetic Mutation.  
<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01760005?term=gantenerumab+al zheimer&rank=1>.
- [48] Dominantly Inherited Alzheimer Network (DIAN).  
<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00869817?term=dian+alzheimer&r ank=1>.
- [49] Clinical Trial of Solanezumab for Older Individuals Who May be at Risk for Memory Loss.

- <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02008357?term=solanezumab+alzheimer&rank=9>.
- [50] J. Delrieu, P. J. Ousset, and B. Vellas. Gantenerumab for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Biological Therapy*; 2012; 12 ; 1077-1086.
- [51] S. Ostrowitzki, D. Deptula, L. Thurfjell, F. Barkhof, B. Bohrmann, D. J. Brooks, W. E. Klunk, E. Ashford, K. Yoo, Z.-X. Xu, H. Loetscher, and L. Santarelli. Mechanism of amyloid removal in patients with Alzheimer disease treated with gantenerumab. *Arch Neurol*; 2012; 69;198-207.
- [52] Gantenerumab Reduces Brain Amyloid in Alzheimer's." <http://www.medscape.com/viewarticle/751500>.
- [53] A Multiple-dose Study of Gantenerumab in Japanese Alzheimer's Disease Patients. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01656525?term=gantenerumab+alzheimer&rank=4>.
- [54] A Study of Gantenerumab in Patients With Prodromal Alzheimer's Disease .<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01224106?term=gantenerumab+alzheimer&rank=3>.
- [55] A Study of Gantenerumab in Patients With Mild Alzheimer Disease.<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02051608?term=gantenerumab+alzheimer&rank=2>.
- [56] H. Shimada. [The DIAN study]" *Brain Nerve*,; 2013; 65; 1179-84.
- [57] O. Adolfsson, M. Pihlgren, N. Toni, Y. Varisco, A. L. Buccarello, K. Antonello, S. Lohmann, K. Piorkowska, V. Gafner, J. K. Atwal, J. Maloney, M. Chen, A. Gogineni, R. M. Weimer, D. L. Mortensen, M. Friesenhahn, C. Ho, R. Paul, A. Pfeifer, A. Muhs, and R. J. Watts. An Effector-Reduced Anti- -Amyloid (A ) Antibody with Unique A Binding Properties Promotes Neuroprotection and Glial Engulfment of A. *Journal of Neuroscience*,; 2012; 32; 9677-9689;
- [58] A Long-Term Safety Extension Study of Studies ABE4869g And ABE4955g in Patients With Mild To Moderate Alzheimer's Disease Treated With Crenezumab. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01723826?term=crenezumab&rank=2>.
- [59] A Study of Crenezumab Versus Placebo in Preclinical PSEN1 E280A Mutation Carriers to Evaluate Efficacy and Safety in the Treatment of Autosomal-Dominant Alzheimer Disease, Including a Placebo-Treated Noncarrier Cohort. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01998841?term=crenezumab&rank=1>.
- [60] S. L. La Porte, S. S. Bollini, T. A. Lanz, Y. N. Abdiche, A. S. Rusnak, W. H. Ho, D. Kobayashi, O. Harrabi, D. Pappas, E. W. Mina, A. J. Milici, T. T. Kawabe, K. Bales, J. C. Lin, and J. Pons. Structural basis of C-terminal  $\beta$ -amyloid peptide

- binding by the antibody ponezumab for the treatment of Alzheimer's disease. *J Mol Biol*; 2012; 421; 525-536.
- [61] I. Miyoshi, Y. Fujimoto, M. Yamada, S. Abe, Q. Zhao, C. Cronenberger, K. Togo, T. Ishibashi, M. M. Bednar, J. W. Kupiec, and B. Binneman. Safety and pharmacokinetics of PF-04360365 following a single-dose intravenous infusion in Japanese subjects with mild-to-moderate Alzheimer's disease: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study. *Int J Clin Pharmacol*; 2013; 51; 911-23.
- [62] J. W. Landen, Q. Zhao, S. Cohen, M. Borrie, M. Woodward, C. B. Billing, K. Bales, C. Alvey, F. McCush, J. Yang, J. W. Kupiec, and M. M. Bednar. Safety and pharmacology of a single intravenous dose of ponezumab in subjects with mild-to-moderate Alzheimer disease: a phase I, randomized, placebo-controlled, double-blind, dose-escalation study. *Clin. Neuropharmacol*; 2013; 36;14-23.
- [63] A. H. Burstein, Q. Zhao, J. Ross, S. Styren, J. W. Landen, W. W. Ma, F. McCush, C. Alvey, J. W. Kupiec, and M. M. Bednar. Safety and pharmacology of ponezumab (PF-04360365) after a single 10-minute intravenous infusion in subjects with mild to moderate Alzheimer disease. *Clin Neuropharmacol*; 2013; 36; 8-13.
- [64] Single Ascending Dose Study of BIIB037 in Subjects With Alzheimer's Disease <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01397539?term=BIIB037&rank=2>.
- [65] Multiple Dose Study of BIIB037 in Subjects With Prodromal or Mild Alzheimer's Disease. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01677572?term=BIIB037&rank=1>.
- [66] N. R. Relkin, P. Szabo, B. Adamiak, T. Burgut, C. Monthe, R. W. Lent, S. Younkin, L. Younkin, R. Schiff, and M. E. Weksler. 18-Month study of intravenous immunoglobulin for treatment of mild Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*; 2009; 30; 1728-1736.
- [67] D. a Loeffler. Intravenous immunoglobulin and Alzheimer's disease: what now?. *J Neuroinflammation*; 2013; 10; 70.
- [68] R. Dodel, A. Rominger, P. Bartenstein, F. Barkhof, K. Blennow, S. Förster, Y. Winter, J. P. Bach, J. Popp, J. Alferink, J. Wiltfang, K. Buerger, M. Otto, P. Antuono, M. Jacoby, R. Richter, J. Stevens, I. Melamed, J. Goldstein, S. Haag, S. Wietek, M. Farlow, and F. Jessen. Intravenous immunoglobulin for treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease: A phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-finding trial. *Lancet Neurol*; 2013; 12; 233-243
- [69] Study of Intravenous Immunoglobulin in Amnestic Mild Cognitive Impairment . <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01300728?term=ivig+ALZHEIMER&rank=3>.

- [70] A Study to Evaluate Albumin and Immunoglobulin in Alzheimer's Disease  
<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01561053?term=ivig+ALZHEIMER&rank=5>.
- [71] New Trials Aim to Delay, Prevent Alzheimer's.  
<http://www.medscape.com/viewarticle/768099>.
- [72] E. M. Reiman, J. B. S. Langbaum, A. S. Fleisher, R. J. Caselli, K. Chen, N. Ayutyanont, Y. T. Quiroz, K. S. Kosik, F. Lopera, and P. N. Tariot. Alzheimer's Prevention Initiative: a plan to accelerate the evaluation of presymptomatic treatments. *J Alzheimers Dis*; 2011; 321-9.
- [73] M. Storandt, D. A. Balota, A. J. Aschenbrenner, and J. C. Morris. Clinical and Psychological Characteristics of the Initial Cohort of the Dominantly Inherited Alzheimer Network (DIAN). *Neuropsychology*; 2013.