

144



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"Ensamblaje de un DNA que codifica fragmentos variables de cadena sencilla (scfv) de inmunoglobulinas anti-péptido beta-amiloide"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A:

JOSE ANGEL MONTERO SANTAMARIA



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. GOHAR BERBERGANYAN.



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Ensamblaje de un DNA que codifica fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) de inmunoglobulinas anti-péptido beta-amiloide".

realizado por José Angel Montero Santamaría
con número de cuenta 9229030-9 , quien cubrió los créditos de la carrera de Biología.
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Golar Gevorgyan

Propietario
Propietario

Dr. Karen Manucharyan
Dra. María de Lourdes Massieu Trigo

Suplente
Suplente

Dra. Luz María López Marín
Biol. Alejandro Huerta Saquero

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Consejo Departamental de Biología

Dra. Patricia Ramos Morales



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

RESUMEN

"Ensamblaje de un DNA que codifica fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) de inmunoglobulinas anti-péptido beta-amiloide".

Por José Angel Montero Santamaría

Directora de Tesis: Dra. Gohar Gervorgyan

El péptido β -Amiloide es el principal componente de las placas amiloides cerebrales y juega un papel importante en la enfermedad de Alzheimer. Actualmente existe interés por encontrar compuestos que selectivamente inhiban la agregación y/o destruyan agregados del péptido en el cerebro. En el presente estudio se obtuvieron ratones hiperinmunes contra el péptido β -Amiloide₄₂. Sus linfocitos se utilizaron como fuente de RNAm para obtener los genes variables (V_H y V_L) de inmunoglobulinas anti-péptido β -Amiloide₄₂ y ensamblar un DNA que codifica fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) anti-péptido β -Amiloide₄₂. Este fragmento de DNA se clonará en un fagémido y se expresará en el fago filamentosos M13 para generar una biblioteca de scFv anti-péptido β -Amiloide₄₂. De esta biblioteca se seleccionarán clones afines al péptido β -Amiloide₄₂ y se evaluarán como terapéuticos en la enfermedad de Alzheimer.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	2
TABLA DE CONTENIDO	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
ANTECEDENTES.....	5
HIPÓTESIS.....	13
OBJETIVO.....	13
MATERIAL Y METODOS	14
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
CONCLUSIONES	38
PROYECCIONES.....	38
LITERATURA CITADA	39

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Biólogo Experimental Gonzalo Acero Galindo, por su excelente asistencia técnica en el desarrollo de este trabajo. Al Doctor Karen Manoutcharian, a Hugo Santamaría, Carmen Bautista, Erik González, Yetzi Robles y Alberto Cano por todo el apoyo que me brindaron y en especial a la Doctora Gohar Gevorgyan por su paciencia y comprensión en la preparación del presente trabajo.

ANTECEDENTES

El péptido β -Amiloide (β A), es el componente principal de las placas amiloides cerebrales y juega un papel importante en la neuropatología de la enfermedad de Alzheimer (EA) (1-3). En el cerebro se producen fragmentos del péptido β A de una molécula precursora más grande llamada proteína precursora amiloide (APP). Cuando se libera de la célula, los fragmentos del péptido β A se pueden acumular en placas extracelulares. Es importante notar que no solo fibrillas del péptido β A, sino también formas solubles mas pequeñas de agregados peptídicos de β A (protofibrillas y oligómeros pequeños) que escapan a la detección por métodos diseñados para las fibrillas, están involucrados en la patogénesis de la EA (3). Esta propuesta provee la explicación para la pobre correlación entre carga amiloide fibrilar y la progresión de la enfermedad. En cualquier caso, tanto las fibrillas del péptido β A, como pequeños agregados del mismo, deberían ser prevenidos o destruidos por agentes que sean candidatos para la terapia de la EA.

Los fragmentos del péptido β A son generados mediante la acción de proteasas específicas dentro de la célula y entre las más importantes de estas enzimas están la beta y la gamma secretasa. Teniendo esto en mente, se ha propuesto usar pequeños compuestos que sean capaces de cruzar la barrera hemato encefálica (BHE) y disminuyan pero no eliminen la actividad de la beta y la gamma secretasas con el fin de usarse como terapia en fases clínicas tempranas de la EA. Interferir con las reacciones metabólicas normales del organismo no es deseable y un acercamiento alternativo que

tenga como blanco eventos patológicos como el depósito del péptido β A, podría resultar más apropiado para el tratamiento efectivo y la prevención de la EA.

Existen reportes previos que describen los esfuerzos para encontrar compuestos que selectivamente destruyan placas del péptido β A, así ha sido mostrado que los nitrofenoles inhiben la agregación del péptido β A *in vitro* y causan desagregación de fibras previamente formadas (4). También los nitrofenoles protegen neuronas del hipocampo de ratas en cultivo de los efectos neurotóxicos del péptido β A e inhiben la formación de depósitos del péptido β A en un modelo *in vivo* (4). Fassbender y colaboradores (5) mostraron que fármacos que reducen el colesterol como el simvastatin y lovastatin también son capaces de reducir los niveles intra y extracelulares del péptido β A en cultivos primarios de neuronas de hipocampo y neuronas corticales mixtas. Cobayos tratados con altas dosis de simvastatin mostraron una fuerte y reversible reducción del péptido β A en el cerebro.

La neuropatología de la EA ha sido observada en ratones transgénicos de la APP humana, donde se producen elevados niveles cerebrales del péptido β A. Experimentos usando estos modelos murinos de la EA (modelo murino transgénico PDAPP) proveen respuestas a muchas preguntas importantes relacionadas con el péptido β A y la EA. Así se ha demostrado que la inmunización de ratones PDAPP con péptido β A reduce significativamente agregados del péptido β A y ciertas características neuropatológicas similares a esta neuropatía en ratones de edad avanzada, y también esencialmente previene la agregación del péptido β A, la distrofia neurítica y la astrogliosis en animales

jóvenes (6). Estos resultados sugieren por primera vez que la inmunización con βA puede ser efectiva en la prevención y tratamiento de la EA. Posteriormente Janus y colaboradores mostraron que la inmunización con péptido βA reduce su depósito en el cerebro y la disfunción cognitiva en el modelo murino TgCRND8 de la EA (7). En otro estudio de inmunización con el βA por Morgan y colaboradores (8) en Florida se demostró que la vacunación de ratones transgénicos PDAPP con el péptido βA los protegía de las deficiencias de aprendizaje y de la memoria relacionadas con la edad.

En los estudios mencionados se utilizó péptido βA incubado toda la noche en buffer para inmunizar a los ratones. Estas soluciones del péptido βA típicamente contienen fibrillas junto con pequeños agregados; sin embargo dada la baja inmunogenicidad de las fibrillas de βA , se requirieron repetidas administraciones del antígeno para obtener altos niveles de anticuerpos anti- βA . Sin embargo, la inmunización con fibrillas puede ser tóxica (8). En el intento de diseñar otros inmunógenos capaces de inducir anticuerpos anti- βA con propiedades anti-agregación, se identificaron epítopes de los anticuerpos anti- βA ya reportados, usando péptidos sintéticos y bibliotecas de péptidos expresados en fagos filamentosos. Demostrando que los residuos EFRH localizados en las posiciones 3 al 6 del extremo amino terminal del péptido βA , comprenden el epítipo inmunodominante y el principal sitio regulador para la formación de fibrillas (9). Subsecuentemente los fagos filamentosos que expresaban el péptido EFRH fueron usados como inmunógenos específicos no tóxicos en cobayos para la producción de anticuerpos que evitaban la agregación del péptido βA *in vitro* (10). Estos autores han

demostrado que los anticuerpos en suero, generados contra el fago que expresa el péptido EFRH, previenen los efectos neurotóxicos y desagregan fibrillas de β A.

Una de las desventajas de cualquier procedimiento de inmunización activa es la generación de una fuerte respuesta inmune que no es deseable en una población de pacientes mayores afectados por la EA. La idea de que la inmunoterapia pasiva puede ser más apropiada para estos individuos, promueve esfuerzos hacia la generación de anticuerpos capaces de prevenir y destruir agregados del péptido β A. Así ha sido demostrado que los anticuerpos monoclonales desarrollados contra fragmentos de péptido β A que abarcan los residuos de aminoácidos 1-28, previenen la agregación y desagregan fibrillas de péptido β A *in vitro* (11,12). Bard y colaboradores demostraron que la administración de anticuerpos monoclonales y policlonales contra el péptido β A entran al sistema nervioso central y reducen la carga de placas aunada a la reducción de la patología en un modelo murino de EA (13).

Dado que los efectos patológicos del péptido β A son conferidos sólo al sistema nervioso central (SNC) los anticuerpos a ser utilizados en la terapia de la EA deben superar la baja permeabilidad de la BHE y ser dirigidos dentro del cerebro a los agregados de péptido β A.

Los anticuerpos representan la familia de proteínas molecularmente más diversa y estudiada estructuralmente. Su uso terapéutico en humanos ha sido estudiado por más de cien años. Su papel como moléculas de unión adaptables de especificidad definida

se ha sumado a la biología molecular en la última mitad de este siglo. De esta forma los anticuerpos juegan un papel central en la ciencia básica y en nuestra sobrevivencia. La afinidad de una molécula de anticuerpo hacia su ligando se ha correlacionado con su potencia de neutralización. Así se han desarrollado estrategias para mejorar la afinidad. Para su aplicación terapéutica y profiláctica los anticuerpos de muy alta afinidad reducen la dosis de aplicación y extienden el tiempo de protección para una enfermedad (31).

Los dominios variables de los anticuerpos se constituyen por una lámina β conocida como "framework" con tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) hipervariables. El sitio de unión al antígeno está formado por CDRs de las cadenas ligera y pesada. Para los dominios variables de la cadena pesada de una inmunoglobulina (VH) la diversidad de secuencias de los primeros dos CDRs son codificados por un repertorio de aproximadamente cincuenta segmentos de la línea germinal VH. El tercer CDR es generado de la recombinación de estos segmentos con aproximadamente treinta segmentos J. Las estructuras y longitudes de los primeros dos CDRs es restringida, pero aquella del CDR3 es muy variada. En un individuo la composición y la frecuencias de los genes V es muy compleja, impuesta por la variación alélica, la delección polimórfica y la delección de clonas autoreactivas (28).

En el sistema inmune, los anticuerpos con afinidad moderada para un antígeno son seleccionados de los repertorios primarios y sus afinidades son mejoradas mediante rondas de mutaciones somáticas y selección. Cálculos de probabilidad de afinidad

indican que entre más grande sea el repertorio de anticuerpos sintéticos, mayor será la probabilidad de encontrar anticuerpos de alta afinidad (30).

Los fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) consisten de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de anticuerpos, unidos por un péptido espaciador corto. Pueden producirse fragmentos scFv específicos como una biblioteca diversa expresada en la superficie de fagos filamentosos. Este procedimiento tiene algunas ventajas importantes: primero, la estrategia de la expresión en bacteriófagos filamentosos permite la selección rápida y simple de productos con propiedades deseadas; segundo, los fragmentos scFv pueden ser producidos en grandes cantidades en bacterias y tercero, los genes de los fragmentos scFv pueden ser manipulados para introducir mutaciones que aumenten su afinidad. Además, los epitopes que son reconocidos por los fragmentos scFv pueden mimetizar la conformación de un antígeno cuando es necesario para la inducción de una respuesta inmune protectora. Se ha demostrado que a partir de bibliotecas de scFv expresadas en fagos filamentosos, tan pequeñas como 4×10^4 , obtenidas de esplenocitos, se pueden obtener fragmentos scFv específicos para un antígeno con el que se inmunizó (41).

Estudios pioneros han documentado la actividad de fragmentos de anticuerpos Fab recombinantes virus-específicos y fragmentos scFv *in vitro*. Algunos autores piensan que las scFv pueden incrementar las características para aplicaciones terapéuticas por su reducido tamaño que mejora la penetración en los tejidos. Además se ha demostrado que la protección contra enfermedades letales no requiere mecanismos

mediados por la Fc de anticuerpos y que la especificidad cruzada no es crucial para la protección contra dosis virales fisiológicamente relevantes *in vivo* (42).

Actualmente los fragmentos mas usados de los anticuerpos son los fragmentos de unión al antígeno (Fab) y los fragmentos variables de cadena sencilla scFv, los que son obtenidos por asociación de los dominios variables de la cadena pesada y ligera de una molécula de inmunoglobulina y un péptido flexible (linker) de 15 a 20 residuos. La expresión de anticuerpos en la superficie de bacteriófagos filamentosos dio origen a los anticuerpos recombinantes, demostrando las propiedades terapéuticas en varios modelos de enfermedades y recientemente se ha demostrado que los fagos pueden ser usados como vehículos para la administración génica (14).

Frenkel y colaboradores aplicaron en fagos filamentosos que expresaron fragmentos de anticuerpos a estudios de la EA, construyeron un anticuerpo de cadena sencilla a partir de un anticuerpo monoclonal anti- β A (15). Mediante mutaciones en la secuencia original de una molécula de inmunoglobulina estos autores mejoraron las variantes de la molécula con propiedades anti-agregación, y obtuvieron anticuerpos con afinidades más altas y con estabilidad mejorada para su almacenamiento.

Una biblioteca de anticuerpos expresados en fagos filamentosos puede ser construida de los genes de inmunoglobulinas obtenidos a partir de células B utilizando diferentes fuentes como bazo, ganglios o sangre periférica. Se pueden utilizar células de donadores inmunizados con un antígeno de interés así como donadores "ingenuos", que son aquellos que no han sido expuestos al antígeno de interés. También se pueden

utilizar animales (generalmente ratones) inmunizados con un antígeno de interés, en este caso las librerías de anticuerpos pueden contener una gran mezcla de anticuerpos relevantes los cuales pueden ser seleccionados contra un antígeno dado (19-22). De esta forma, el uso de librerías de scFv ha generado intracuerpos que han contrarrestado *in situ* la agregación de la proteína de Huntingtin en modelos celulares de la enfermedad de Huntington (16).

Para la EA los scFv anti- β A son de gran interés y pueden ser aplicados tanto extracelularmente como intracelularmente (intracuerpos). Éstos scFv pueden prevenir la formación de agregados del péptido β A, disolver fibrillas, profibrillas u oligómeros existentes y como en el caso de los intracuerpos pueden interferir las interacciones de APP con otros factores que están involucrados en la patología. Es importante notar que estudios recientes han demostrado la acumulación y la inmunoreactividad intraneuronal del péptido β A₄₂, así como la presencia de dímeros estables de β A₄₂ antes de que se liberasen al medio en cultivos de neuronas (1,17). Estas observaciones enfatizan el potencial terapéutico de los intracuerpos para prevenir la agregación intraneuronal del péptido β A₄₂ en el tratamiento de la EA, previamente se ha sugerido el potencial terapéutico de los intracuerpos en estudios tumor-específicos (18).

HIPÓTESIS

Si los anticuerpos anti-péptido β -amiloide evitan la agregación y/o favorecen la desagregación de aglomerados del péptido, entonces los fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) de inmunoglobulinas anti-péptido β -amiloide pueden tener los mismos efectos en modelos de estudio de la enfermedad de Alzheimer.

OBJETIVO

Ensamblar fragmentos variables de las cadenas ligera y pesada (V_H y V_L) de inmunoglobulinas anti péptido βA_{42} , en un DNA que codifique fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) para su posterior expresión en un vector fagémido y la obtención de una biblioteca de scFv expresada en bacteriófagos filamentosos.

MATERIAL Y METODOS

INMUNIZACIÓN DE RATONES CON PÉPTIDO β -AMILOIDE

Para utilizar el péptido βA_{42} (Bachem, EUA) se resuspendió en PBS 1x y se incubó a 37 °C durante toda la noche, siguiendo el protocolo de Morgan, y colaboradores (2000). En particular el péptido βA_{42} forma oligómeros solubles extremadamente rápido cuando se incubaba a 37 °C y pH 7.4 y se sabe que las soluciones frescas del péptido βA_{42} son tóxicas a líneas celulares humanas (23).

Como lote experimental se utilizaron 2 ratones singénicos BALB/c hembras de 4 a 6 semanas de edad, los que se inmunizaron subcutáneamente cuatro veces con el péptido βA_{42} cada 14 días como lo describen Morgan y colaboradores (2000), cada vez se resuspendió péptido βA_{42} en PBS 1x y se incubó a 37 °C durante toda la noche. En la primera inmunización se utilizó adyuvante de Freund completo (Sigma, EUA) en proporción 1:1 con el péptido preparado y en las tres subsecuentes inmunizaciones se utilizó adyuvante de Freund incompleto (Sigma, EUA) en la misma proporción.

Como lote control se utilizaron 3 ratones singénicos BALB/c hembras de 4 a 6 semanas de edad, los que recibieron 100 μ l de PBS 1x (filtrado con una membrana con poros de 0.40 μ m de diámetro) subcutáneamente, en las mismas fechas que el lote experimental. De la misma forma, se utilizó adyuvante de Freund completo (Sigma, EUA) en proporción 1:1 con el PBS en la primera inmunización y adyuvante de Freund incompleto (Sigma, EUA) en dicha proporción, para las tres inmunizaciones posteriores.

Después de la tercera y cuarta inmunización se sangró a todos los ratones mediante la punción del plexo retroorbital de la siguiente manera: se protruyó el globo ocular y se punzó con una pipeta pasteur el plexo para coleccionar por capilaridad la sangre. Posteriormente se incubó a 37°C por una hora para favorecer la coagulación y en una centrifuga clínica a 400 rpm durante diez minutos se separó el suero del plasma. Finalmente se prepararon alícuotas de 200 µl que se almacenaron a -20 °C para su uso posterior.

ENSAYO DE ELISA PARA CARACTERIZAR Y TITULAR ANTICUERPOS ANTI PÉPTIDO β-AMILOIDE

Se realizó un ensayo de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) para evaluar la producción de anticuerpos específicos contra el péptido β-amiloide.

Se sensibilizó una placa de ELISA Nunc Maxisorp con péptido β-amiloide a concentración de 2 µg/ml con 100 µl por pozo, que se preparó como se describe anteriormente. Como antígeno no relacionado se utilizó un extracto de *Taenia solium* (ETS) que se tenía en stock, a una concentración de 10 µg/ml con 100 µl por pozo, la placa se incubó a 4 °C durante toda la noche.

Se efectuaron cuatro lavados con PBS-TWEEN al 0.1% y se bloqueo la placa con solución bloqueadora (Zymed, EUA) en cantidad de 200 µl por pozo durante 1 h a 37° C.

Se efectuaron 4 lavados con PBS-TWEEN al 0.1%, se adicionaron a la placa los sueros de los ratones de los lotes experimental y control, así como un suero de un ratón

hiperinmune anti-ETS. Los sueros se utilizaron en dilución de 1:200 en PBS-BSA 1%, la placa se incubó con 100 μ l por pozo durante 1 h a 37 °C.

Se lavo la placa con PBS-TWEEN al 0.1% 4 veces y se agregaron los anticuerpos anti IgG total, anti IgG1 y anti IgG2a de ratón, conjugados con la enzima HRP (Zymed) en dilución de 1:5000 para el anti IgG total y 1:500 para el anti IgG1 y anti IgG2a. Para las diluciones se utilizó PBS-BSA al 1%, y se colocaron 100 μ l en cada pozo de la placa.

Finalmente se reveló con el sustrato 2',2' -Azino-Bis/3-Ethylbenz-thiazoline-6-sulphonic acid (ABTS de Zymed) y se leyeron las densidades ópticas (DO) a 405 nm de toda la placa en un lector de placas de ELISA Dynex Opsys.

Para la titulación de los anticuerpos se utilizó el formato de ELISA anteriormente descrito. Se hicieron diluciones seriadas de 1:200 hasta 1:100000 de los sueros de los ratones experimentales y controles en PBS-BSA 1%.

EXTRACCIÓN DE mRNA.

Para garantizar el ambiente libre de nucleasas (DNAsas y RNAsas), se preparó una solución de dietilpircarbonato (DEPC) al 0.1% en agua mili Q de 1.8 M Ω y se esterilizó por 20 minutos a 120° C y 1.5 P/in². Se trataron todos los materiales con esta agua. La superficie de trabajo se limpió con una solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0.01% y siempre se utilizó material estéril.

Se utilizaron los dos ratones hiperinmunes del lote experimental para la extracción de mRNA a partir de células de bazo y nódulos linfáticos inguinales.

Una vez disectados los nódulos linfáticos se colocaron cada uno en una caja de petri colocada sobre una capa de hielo con una solución de PBS 1x estéril. Se limpiaron del tejido adiposo y conjuntivo circundantes y se homogenizaron manualmente, luego por decantación se separaron los restos de tejido de las células que quedaron en suspensión y se mantuvieron en PBS 1x estéril frío.

El bazo de cada ratón, una vez disectado, se perfundió con PBS 1x estéril para obtener una suspensión celular, la que posteriormente se separó de los restos tisulares por decantación.

Se mezclaron las suspensiones celulares obtenidas tanto de los nódulos linfáticos como del bazo y se centrifugó a 200 x g para precipitar las células. Se descartó el sobrenadante.

Posteriormente se utilizó el Quick prep mRNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech, EUA) siguiendo las indicaciones del fabricante para obtener mRNA de las células aisladas anteriormente.

Se agregaron 1.5 ml de Extraction Buffer al paquete celular, la suspensión se hizo pasar por una jeringa con aguja de 21 gauge para lisar las células. Se adicionaron 3 ml de Elution Buffer y se centrifugó a 12000 x g durante diez minutos.

Mientras tanto se invirtió varias veces la columna Oligo (dT)-Cellulose Spun Column para resuspender la matriz, se colocó en un tubo de 15 ml y se centrifugó a 350 x g por 2 minutos. Se descartó el líquido del tubo.

Se utilizó una pipeta para transferir 4 ml sólo del sobrenadante de la suspensión celular dentro de la columna, se mezcló cuidadosamente por 10 minutos mediante inversión manual lenta. Se colocó la columna en un tubo de 15 ml, se centrifugó a 350 x g por 2

minutos para separar la resina de la suspensión, se decantó y se descartó la suspensión.

Se aplicaron 3 ml de High-Salt Buffer, se resuspendió la matriz mediante agitación cuidadosa y se centrifugó a 350 x g por 2 minutos. Mediante decantación se descartó el sobrenadante; se repitió este lavado de High-Salt Buffer dos veces más.

Posteriormente se aplicaron 3 ml de Low-Salt Buffer, se resuspendió la matriz mediante agitación cuidadosa y se centrifugó a 350 x g por 2 minutos. Mediante decantación se descartó el sobrenadante; se repitió una vez más este lavado con Low-Salt Buffer.

A continuación se colocó un tubo de 1.5 ml dentro del tubo de 15 ml y se eluyó el mRNA mediante centrifugación a 350 x g durante 2 minutos con 0.25 ml de Elution Buffer precalentado a 65 °C. Este procedimiento se repitió tres veces con la misma columna.

Para precipitar el mRNA obtenido, se adicionaron 50 µl de una solución de acetato de potasio y 10 µl de una solución de glicógeno por cada 500 µl de muestra, además se adicionaron 1 ml de etanol absoluto a -20°C. Se mantuvo en congelación a -80°C toda la noche, posteriormente se colectó el mRNA precipitado mediante microcentrifugación a 4° C por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se evaporó el exceso de líquido. Se resuspendió el mRNA en 20 µl de agua-DEPC.

La muestra obtenida se analizó mediante una electroforesis en gel de Tris-borato-EDTA (TBE) agarosa 1% con 0.5% bromuro de etidio. Se verificó la presencia de RNA.

SÍNTESIS DE LA PRIMERA CADENA DE cDNA

Se utilizó el First-Strand cDNA Síntesis Kit (Pharmacia Biotech, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La reacción de síntesis de la primera cadena de cDNA se realizó por duplicado, se colocaron 20 μ l de mRNA en un microtubo, se calentó a 65 °C por 10 minutos y se enfrió en hielo. Separadamente en otro microtubo se colocaron 11 μ l de Bulk First-Strand Reaction Mix en suspensión uniforme (sin precipitados), 1 μ l de ditiotritol (DTT) y 1 μ l de primer (hexadexynucleótidos aleatorios en solución acuosa). Finalmente se adicionó el mRNA desnaturalizado, y se incubó la reacción a 37 °C por una hora.

PRIMERA AMPLIFICACIÓN POR PCR

Para la primera amplificación mediante PCR (polimerase chain reaction), se utilizó el Mouse ScFv Module/ Recombinant Phage Antibody System (Amersham Pharmacia Biotech) siguiendo las instrucciones del fabricante.

En un tubo de 0.5 ml se colocaron 33 μ l de first-strand cDNA de la reacción anterior, 2 μ l de Light Primer Mix y 64 μ l de agua destilada estéril para amplificar los genes variables de la cadena ligera (V_L). Para amplificar los genes variables de la cadena pesada (V_H), en un tubo de 0.5 ml se colocaron 33 μ l de first-strand cDNA de la reacción anterior, 2 μ l de Heavy Primer1, 2 μ l de Heavy Primer2 y 62 μ l de agua destilada estéril.

Se calentaron ambos tubos a 95 °C por 5 minutos y posteriormente se adicionó a cada tubo 1 μ l de Taq DNA polymerase (Gibco, EUA), y se alcanzó un volumen de reacción de 100 μ l.

Se realizaron 30 ciclos de amplificación en un termociclador Perkin Elmer 9600 mediante las siguientes temperaturas de reacción: 94 °C por 30 segundos; 55 °C por 1 minuto; y 72 °C por 1 minuto.

PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA PRIMERA AMPLIFICACIÓN POR PCR.

Los productos de la primera amplificación por PCR se purificaron mediante una electroforesis en un gel de Tris acetato EDTA (TAE) 0.5x, agarosa 1.5% con 0.5% bromuro de etidio.

Se cargaron en el gel 50 μ l de V_L y 50 μ l de V_H de la reacción anterior así como 2 μ l de un marcador de peso molecular de 100 pb. Para todas las muestras se utilizaron 15 μ l de colorante de carga (30% de glicerol, 0.25% de azul de bromofenol en buffer Tris EDTA 10 mM, pH 7).

Se fijó el voltaje a 80 V DC, y se corrió hasta que el colorante migró dos tercios de la longitud del gel. El gel se observó en un transiluminador de luz UV y se cortaron las bandas de 340 pb (que corresponde a V_H) y 325 pb (que corresponde a V_L) con una hoja de bisturí estéril para cada banda. Los pedazos de gel se secaron en una toalla de papel, se fragmentaron lo más delgado posible y se colocaron en dos columnas microspin vacías.

Cada columna se colocó en dos microtubos estériles y se centrifugaron ambas columnas a 735 x g durante dos minutos para coleccionar el DNA.

ANALISIS DE LOS PRODUCTOS PURIFICADOS.

Se preparó un gel de TAE 0.5x, agarosa 1.5% con 0.5% bromuro de etidio. De cada DNA eluido (V_H y V_L) se hicieron dos diluciones 1/20 y 1/40, en un volumen final de 5 μ l de cada dilución y se utilizó 1 μ l de colorante de carga para cada una. Así mismo se cargaron dos muestras de V_H marker, una de 2.5 μ l y la otra de 5 μ l, con 1 μ l de colorante de carga cada una.

Se compararon visualmente las intensidades de las diluciones del DNA de V_H y V_L con las intensidades de las diluciones del V_H marker. Así se estimó la concentración del DNA eluido.

REACCION DE ENSAMBLAJE Y LLENADO

Durante la reacción de ensamblaje, el DNA de los genes V_H y V_L de las inmunoglobulinas, se une mediante un linker y se utiliza una polimerasa para rellenar la construcción. La reacción de ensamblaje y llenado se llevó a cabo con la siguiente mezcla de reacción: 20 μ l (50 ng) de DNA V_L , 10 μ l (50 ng) de DNA V_H , 4 μ l de linker-primer mix, 5 μ l de 10X PCR buffer, 2.5 μ l dNTP mix (25 mM de cada dNTP), 5 μ l de

MgCl₂ (25 mM), 1 µl AmpliTaq DNA polimerasa (5 U), 2.5 µl de agua destilada estéril, para un volumen de reacción de 50 µl. Se realizó en un termociclador GENEAMP BIORAD, con 7 ciclos de ensamblaje y llenado con las siguientes temperaturas y tiempos: 94°C por 1 minuto, 63°C por 4 minutos.

SEGUNDA AMPLIFICACIÓN POR PCR Y PURIFICACIÓN

Se amplificó la construcción recién ensamblada y se le adicionaron dos sitios de restricción (5' Sfi I y 3' Not I) para su posterior clonación en un vector de expresión. Se preparó en un microtubo una mezcla de reacción como se indica: 1µl AmpliTaq DNA polimerasa (5 U), 5 µl 10X PCR buffer, 1µl dNTP mix (25 mM de cada dNTP) 4µl RS primer mix, 39 µl agua destilada estéril, para un volumen de reacción de 50 µl.

Esta mezcla de reacción se adicionó a la reacción anterior inmediatamente y se realizaron en un termociclador GENEAMP de BIORAD 30 ciclos de amplificación de 94° C durante 30 segundos, 55 ° C durante 1 minuto, 72 ° C durante 1 minuto.

Se utilizaron las columnas microspin para purificar los productos de la reacción de PCR. Para esto se resuspendió la resina Sephacryl S-400 HR por agitación cuidadosa, se colocaron 750 µl de la suspensión en una columna microspin, se centrifugó a 735 x g durante un minuto y se desechó el filtrado. Se le adicionaron 200 µl de buffer TE, se centrifugó en las mismas condiciones, este paso se repitió dos veces y se transfirió la columna a un microtubo estéril.

Se colocó la segunda reacción de amplificación por PCR (los 100 μ l), se centrifugó a 735 x g durante 2 minutos, se descartó la columna y en el microtubo se colectó el DNA del scFv ensamblado y purificado.

CUANTIFICACION EN GEL DEL DNA scFv PURIFICADO

Se preparó un gel de TAE 0.5x, agarosa 1.5% con 0.5% bromuro de etidio. Se hicieron dos diluciones 1/2 y 1/4 del scFv obtenido mediante la purificación anterior, cargándolas con 1 μ l de colorante de carga cada una. Se colocaron dos muestras de scFv marker, una de 2.5 μ l y la otra de 5 μ l, con 1 μ l de colorante de carga cada una.

Se compararon visualmente las intensidades de las diluciones del DNA de scFv con las intensidades de las diluciones del scFv marker para estimar su cantidad.

REAMPLIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL FRAGMENTO ScFv

Debido a que la concentración del scFv ensamblado resultó insuficiente para los procedimientos posteriores, se armó una reacción de reamplificación como sigue: 12 μ l de DNA scFv (10 ng), 4 μ l RS primer mix, 10 μ l PCR buffer, 1 μ l 25 mM de cada dNTP, 1 μ l (5 U) Amplitaq DNA polimerasa, 77 μ l agua destilada estéril, para un volumen final

de 100 μ l. Se realizaron 30 ciclos de amplificación de 94° C durante 30 segundos, 55 ° C durante 1 minuto, 72 ° C durante 1 minuto, en un termociclador GENEAMP BIORAD.

Se utilizó una columna microspin para purificar los productos de la reamplificación del fragmento scFv como se describe con anterioridad y posteriormente mediante un gel de TAE 0.5x, agarosa 1.5% con 0.5% bromuro de etidio. Se compararon visualmente las intensidades de las diluciones de DNA scFv con las intensidades de las diluciones del scFv marker para estimar la cantidad de scFv obtenida.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

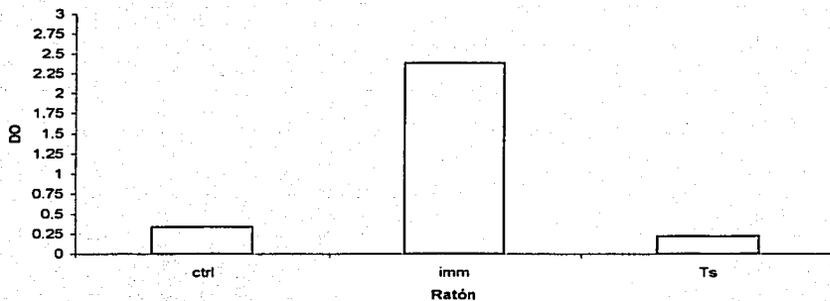
En la EA la forma neurotóxica del péptido βA corresponde a las fibrillas pero algunos oligómeros intermediarios entre la forma monomérica y fibrilar del péptido βA presentan neurotoxicidad (24). De esta manera en un paciente con la EA existe una población mixta de oligómeros y fibrillas del péptido βA ; con la estrategia de inmunización en este trabajo, se logró la exposición tanto de fibrillas como de oligómeros del péptido βA .

En modelos transgénicos la estrategia de inmunización seguida en este estudio ha disminuido la carga del péptido en el cerebro, ha beneficiado la estructura de las neuronas, ha aportado mejoras en la memoria y el aprendizaje e indirectamente ha sido capaz de activar a la microglía. Algunos autores proponen que los anticuerpos terapéuticos diseñados contra oligómeros y no contra fibrillas podrían ser determinantes en etapas tempranas de la enfermedad (25).

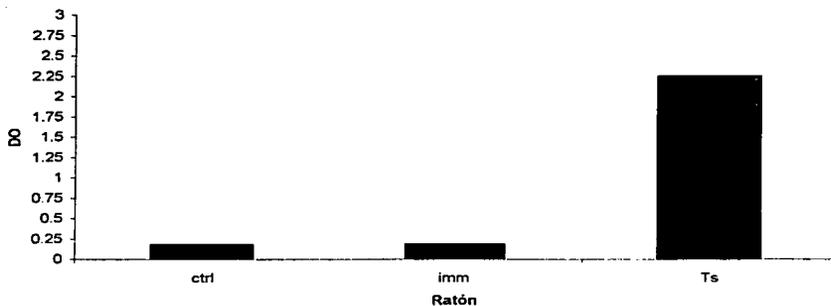
En este proyecto después de 4 inmunizaciones con el péptido βA se realizó una prueba de ELISA para verificar si en los sueros de los ratones inmunizados existían anticuerpos anti- βA como resultado de una respuesta inmune humoral. Para esto se inmovilizó el péptido βA a la placa y se compararon las IgGs totales en suero de los ratones del lote experimental respecto del lote control y se encontró una diferencia de 2.03 unidades de DO (Gráfica 1). También se probó un suero de un ratón inmunizado con un antígeno no relacionado (extracto de *Taenia solium*), y se observó una diferencia de 2.1 unidades de DO en las IgG totales respecto a los ratones inmunizados con el péptido βA (Gráfica 1).

Mediante el mismo formato de ELISA se comprobó la especificidad de las IgGs hacia el péptido β A. Utilizando un antígeno no relacionado (ETS) inmovilizado a la placa, se encontraron 2.06 unidades de DO de diferencia entre los sueros del lote control y experimental respecto al suero del ratón inmunizado con el antígeno no relacionado (Gráfica 2).

Estos resultados indican que los ratones inmunizados con el péptido β A montaron una respuesta inmune humoral específica contra dicho péptido. Considerando que la suspensión del péptido utilizada para los procedimientos de inmunización contenía tanto formas fibrilares como oligómeros, se postula que las inmunoglobulinas generadas pueden reconocer tanto la forma fibrilar como la forma oligomérica del péptido β A.



Gráfica 1. ELISA para detectar IgG en el suero de ratones control (ctrl), inmunizados con el péptido β A (imm) e inmunizados con extracto de *Taenia solium* (Ts) como antígeno no relacionado. Ensayo con péptido β A inmovilizado en la placa.



Gráfica 2. ELISA para detectar IgG en el suero de ratones control (ctrl), inmunizados con el péptido β A (imm) e inmunizados con extracto de *Taenia solium* (Ts) como antígeno no relacionado. Ensayo con extracto de *Taenia solium* inmovilizado en la placa.

Posteriormente se realizaron los ensayos de ELISA para determinar que subtipos de IgG son principalmente inducidos durante la inmunización. Con este propósito se inmovilizó el péptido β A a la placa y se probaron los sueros de los ratones experimentales, controles y un suero anti- extracto de *Taenia solium*.

Como se demuestra en la gráfica 3, la mayor cantidad de IgGs en el suero de los ratones inmunizados con péptido β A son del subtipo IgG1 (presenta diferencia de 2.4 unidades de DO respecto al control y 2.2 con el suero del ratón inmunizado con un antígeno no relacionado). Aunque también se demostró la presencia de IgG2a (DO=0.6).

La presencia de inmunoglobulinas de subtipo IgG1, indica una respuesta inmune de tipo TH2 donde se estimula la respuesta humoral, en tanto la presencia de inmunoglobulinas de subtipo IgG2a refiere una respuesta inmune de tipo TH1 donde se favorece la respuesta celular (26).

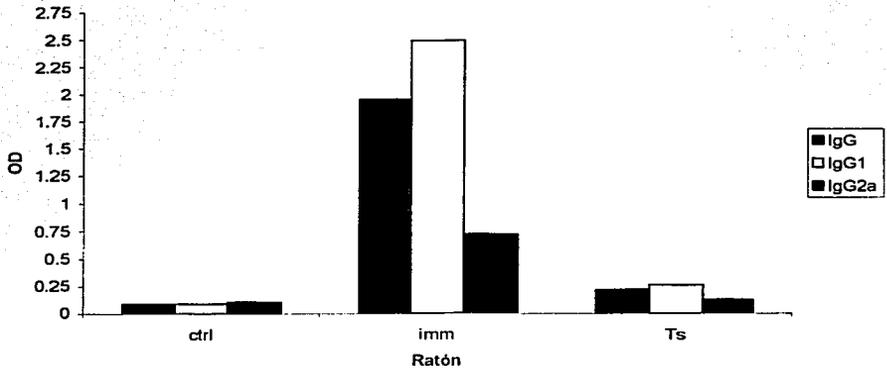
De esta forma se sugiere que la respuesta inmune montada por los ratones inmunizados con péptido β A es principalmente de tipo humoral, por lo que se ve favorecida la producción de anticuerpos que son altamente específicos para el péptido β A.

Subsecuentemente mediante una prueba de ELISA, se realizó la titulación del suero de los ratones de lote experimental, encontrando un título de 1/25000 (Gráfica 4).

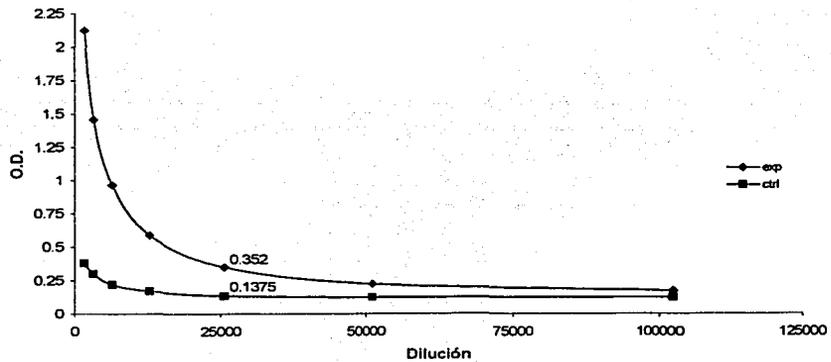
Hoy día una estrategia exitosa para encontrar anticuerpos monoclonales consiste en inmunizar animales experimentales (ratones) con un antígeno de interés para construir a partir del RNA de bazo una biblioteca de fragmentos scFv, aislar los scFv que se unen con mayor afinidad al antígeno y construir posteriormente agentes que contienen estos scFv para probar en modelos experimentales su efectividad. En este tipo de trabajos resulta muy importante el esquema de inmunización y las condiciones de la selección (35).

Después de comprobar que los ratones inmunizados tenían altos títulos de anticuerpos anti- β A, se procedió a la extracción de los genes V_H y V_L de las inmunoglobulinas anti- β A. Para esto se utilizaron como fuente de mRNA las células B del bazo y de los nódulos linfáticos inguinales.

El procedimiento utilizado en el presente trabajo para extraer el mRNA consiste en lisar las células y mediante una columna de oligo (dT)-celulosa capturar el mRNA utilizando la poliadenilación de este. El mRNA obtenido es lo suficientemente puro y con la calidad suficiente para llevar a cabo la síntesis de la primera cadena de cDNA. En nuestro caso en el análisis cualitativo mediante un gel de agarosa, se observó RNA en la muestra obtenida después de la purificación. Durante el procedimiento de extracción de mRNA lo más importante es la limpieza tanto del área de trabajo como de los materiales empleados, por tanto para este estudio se utilizaron materiales y áreas de trabajo libres de nucleasas descritos en el apartado de material y métodos.



Gráfica 3. Caracterización de la respuesta inmune en los sueros de los ratones control (ctrl), inmunizados con péptido β A (imm) y con un antígeno no relacionado (Ts).



Gráfica 4. Titulación del suero de los ratones inmunizados con el péptido β A.

La síntesis de la primera cadena de cDNA se lleva a cabo mediante una transcriptasa reversa, que incorpora los nucleótidos complementarios al mRNA para sintetizar un híbrido de una cadena de mRNA y otra de DNA. En esta reacción es muy importante que la plantilla de mRNA a partir de la que se sintetiza el cDNA se encuentre pura y no degradada, en nuestro experimento esto se aseguró mediante la refrigeración a -80°C y el uso de los materiales y área de trabajo apropiados.

Se ha utilizado la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar genes rearrregados de cadena ligera y pesada de inmunoglobulinas humanas y de ratón, por lo que se han optimizando los primers para PCR para los genes V, clasificándolos por familias, identificando regiones conservadas y regiones distintas. Se han diseñado oligonucleótidos específicos para cada familia que pueden ser usados directamente para amplificar por PCR o bien en la síntesis de cDNA usando linfocitos de sangre periférica o alguna otra fuente de mRNA como templado o plantilla (38). Así mismo se ha descrito el ensamblaje por PCR como un método para la síntesis en un solo paso de secuencias de DNA de mas de 3 kb a partir de oligonucleótidos de 40-nucleótidos (29).

Durante este estudio se utilizó la PCR para amplificar los genes V_H y V_L en la primera cadena de cDNA, esto para obtener en DNA un alto número de copias de dichos genes. En seguida se debe purificar los productos de la reacción de PCR para eliminar los componentes de la reacción que pueden interferir las reacciones subsecuentes. En este estudio se utilizó un método que separa los productos de PCR en un gel de agarosa y luego mediante una columna los eluye de dicho gel, de esta forma se obtiene DNA de

alta calidad y pureza, sin embargo se sacrifica entre el 8-15% del total de DNA en la muestra.

Si bien es cierto que el método más utilizado para la cuantificación de DNA con alto grado de certeza es mediante el uso de un espectrofotómetro de UV, también se puede cuantificar la cantidad de DNA mediante la comparación visual de la intensidad en dos muestras, una de las que contiene una cantidad conocida de DNA. En los experimentos realizados se utiliza la cuantificación de DNA por comparación visual de las intensidades en dos muestras, donde el kit comercial provee una muestra con una cantidad conocida de DNA, que además es del tamaño que deben tener los productos de PCR que se comparan.

En el presente estudio se realizó el ensamblaje de fragmentos de genes variables de las cadenas pesada y ligera (V_H y V_L) de inmunoglobulinas anti-péptido βA , a partir de células de bazo de ratones inmunizados con el péptido β amiloide como se observa en la Figura 1.

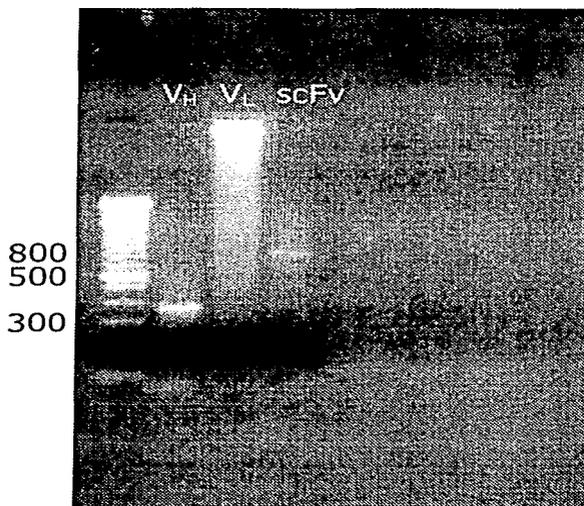


Figura 1. Fragmentos de genes variables de la cadena pesada (V_H) ligera (V_L) y scFv obtenidos a partir de células de bazo de ratones inmunizados con el péptido βA_{42} .

La clonación de genes que codifican los dominios variables de las moléculas de inmunoglobulinas es una parte esencial de la ingeniería de anticuerpos. Se han investigado rutas alternativas para el diseño y construcción de bibliotecas de genes de la región variable de inmunoglobulinas basados en ensamblaje por PCR, así se han construido bibliotecas sintéticas con las regiones determinantes de complementariedad (CDR) totalmente aleatorias variándolas en longitud (32).

En 1990 McCafferty y colaboradores, describieron una metodología que sentó las bases de la tecnología para la expresión de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos en

bacteriófagos filamentosos. Los genes variables (V) de inmunoglobulinas son amplificados por PCR de hibridomas o células B y clonados en vectores de expresión. Los fagos que expresan los genes V pueden ser seleccionados directamente con el antígeno. Los dominios V completos de un anticuerpo pueden ser expresados en la superficie de bacteriófagos y los fragmentos de anticuerpos expresados en fagos pueden ser usados en la exploración de grandes bibliotecas combinatorias (37).

Usando la tecnología de expresión en fagos, los genes V de anticuerpos pueden ser clonados adyacentemente en los genes de la cápside de los bacteriófagos filamentosos y expresados como proteínas funcionales en su superficie.

Pueden utilizarse distintos vectores de expresión como los fagos completos o los fagémidos que son plásmidos de secuencias intergénicas de fagos filamentosos y que en presencia de un fago ayudador, se ensamblan en partículas virales que expresan el gen insertado. El uso de este sistema permite un bajo número de copias en cada partícula de fago lo que minimiza los efectos de la avidéz y produce una selección más astringente.

Las proteínas de la cápside pIII y pVIII han sido usadas exitosamente para expresar Fab, scFv y dianticuerpos. Esta metodología representa una estrategia poderosa para fabricar anticuerpos con características biofísicas pre-determinadas con uso diagnóstico o terapéutico (34).

Los fagos filamentosos son virus largos, delgados y cilíndricos que infectan bacterias que expresan el pilus F, y se replican sin lisar su hospedero. La cápside de los fagos filamentosos esta formada por estructuras tubulares flexibles y delgadas de 900 nm de

longitud y 6 a 10 nm de ancho. La envoltura proteica que rodea al DNA esta hecha de producto del gen VIII, una proteína de 50 residuos de aminoácido en α -hélice, que es la proteína de cubierta principal expresando aproximadamente 2700 copias. El cilindro del fago esta flanqueado por dos estructuras; una hecha de 5 copias de los productos de los genes VII y IX en el lado que deja la membrana bacteriana primero, y en el otro extremo 5 copias de los productos de los genes VI y III (36).

La expresión de fragmentos de anticuerpos en la superficie de bacteriófagos filamentosos es posible mediante la fusión a una proteína de envoltura (la proteína III) tanto en cadenas polipeptídicas sencillas, donde las cadenas variables ligera y pesada (V_H y V_L) están unidas por un polipéptido espaciador, o como cadena ligera y pesada asociadas no covalentemente. Los vectores fagemidos permiten expresar una sola copia del anticuerpo en la superficie del fago, por lo que resultan mejores para seleccionarlos cuando tienen afinidades cercanamente relacionadas, usando un sistema de antígeno inmovilizado en una fase sólida (por ejemplo un ensayo de ELISA) (27).

Se han construido fragmentos de anticuerpos con especificidad preestablecida a partir de poblaciones de linfocitos *in vitro* y clonados para expresar dominios variables de las cadenas ligera (V_L) y pesada (V_H) de inmunoglobulinas en la superficie de bacteriófagos filamentosos. Los fagos afines son seleccionados de un repertorio mediante su unión al antígeno y es posible obtener los fragmentos de anticuerpos de manera soluble. Esta metodología facilita la construcción de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos humanos de valor terapéutico para la investigación básica (39).

La construcción de bibliotecas de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) o fragmentos Fab de moléculas de anticuerpos que son expresados en la superficie de fagos filamentosos y la selección de anticuerpos de fagos recombinantes mediante su unión al antígeno, ofrece una forma nueva y poderosa de generar anticuerpos monoclonales. La principal meta de la tecnología de los anticuerpos recombinantes es desarrollar bibliotecas de gran tamaño y diversidad para facilitar el aislamiento de anticuerpos con alta afinidad a partir de anticuerpos con todas las especificidades posibles. El principal determinante de la diversidad es la fuente de la que se obtienen los genes de los anticuerpos usados en la construcción de las bibliotecas (40).

Es posible incorporar principios de diseño de proteínas para construir un repertorio grande de anticuerpos funcionales, los cuales pueden ser mejorados posteriormente usando estrategias de maduración de afinidad. La selección de anticuerpos de repertorios primarios, seguido de mutagénesis en los CDRs y selección mediante la expresión en bacteriófagos permite la identificación de clonas con afinidad mejorada (43).

Además, dos factores parecen generar una alta frecuencia de clonas reactivas en la biblioteca: primero la fuente de mRNA que tiene una alta representación de cadenas que están en las clonas reactivas *in vivo* y segundo la promiscuidad de las cadenas (principalmente la pesada) para aceptar más de un compañero en una clona reactiva (33).

De esta forma el DNA, que codifica para fragmentos variables de cadena sencilla (scFv), generado en el presente estudio será insertado en un vector de expresión fagémido (pCANTAB 5E de Amersham) y se generarán scFv solubles y unidas a partículas de fago para su evaluación como terapéuticos en la enfermedad de Alzheimer.

CONCLUSIONES

1. En el presente trabajo se generaron ratones hiperinmunes contra el péptido βA_{42} .
2. Se ensambló una molécula de DNA que codifica scFv específicos para el péptido βA_{42} a partir de linfocitos de estos ratones.

PROYECCIONES

1. El DNA que codifica scFv será clonado en un fagémido con el fin de generar una biblioteca de scFv específicos para el péptido βA_{42} expresados en fagos filamentosos M13.
2. A partir de esta biblioteca serán obtenidas clonas de fagos recombinantes para su evaluación como candidatos para el tratamiento de la EA.

LITERATURA CITADA

1. Selkoe, D.J. "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy". *Physiological Reviews* 2001. 81:741-766.
2. Thorsett, E.D., and Latimer, L.H. "Therapeutic approaches to Alzheimer's disease". *Curr Opin Chem Biol* 2000. 4:377-382.
3. Klein, W.L., Kraft, G.A., and Finch, C.E. "Targeting small A β oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum". *Trends in Neuroscience* 2001. 24:219-224.
4. Felice, F.G., Houzel, J.C., Garcia-Abreu, J., Louzada, P.R.F., Afonso, R.C., Meirelles, M.N.L., Lent, R., Neto, V.M., and Ferreira, S.T. "Inhibition of Alzheimer's disease β -amyloid aggregation, neurotoxicity, and in vivo deposition by nitrophenols: implications for Alzheimer's therapy". *FASEB J* 2001.15:1297-1299.
5. Fassbender K., Simons M., Bergmann C., Stroick M., Lutjohann, D., Keller, P., Runz, H., Kuhl, S., Bertsch, T., von Bergmann, K., Hennerici, M., Beyreuther, K., and Hartmann, T. "Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease β -amyloid peptides A β 42 and A β 40 in vitro and in vivo". *Proc Natl Acad Sci EUA* 2001. 98:5856-5861.
6. Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandevent, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D., and Seubert, P. "Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse". *Nature* 1999. 400:173-177.
7. Janus, C., Pearson, J., McLaurin, J., Mathews, P.M., Jiang, Y., Schmidt, S.D., Chisti, M.A., Horne, P., Heslin, D., French, J., Mount, H.T.J., Nixon, R.A., Mercken, M., Bergeron, C., Fraser, P.E., St George-Hyslop, P., and Westaway, D. "A β peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease". *Nature* 2000. 408:979-982.
8. Morgan, D., Diamond, D.M., Gottschall, P.E., Ugen, K.E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D., Connor, K., Hatcher, J., Hope, C., Gordon, M., and Arendash, G.W. "A β peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease" *Nature* 2000. 408:982-985.
9. Frenkel, D., Balass, M., and Solomon, B. "N-terminal EFRH sequence of Alzheimer's beta-amyloid peptide represents the epitope of its anti-aggregating antibodies". *J Neuroimmunol* 1998. 88:85-95.

10. Frenkel, D., Katz, O., and Solomon, B., "Immunization against Alzheimer's β -amyloid plaques via EFRH phage administration" Proc Natl Acad Sci EUA 2000. 97:11455-11459.
11. Solomon, B., Koppel, R., Hanan, E., and Katzav, T. "Monoclonal antibodies inhibit in vitro fibrillar aggregation of the Alzheimer β -amyloid peptide" Proc Natl Acad Sci US 1996. 93:452-455.
12. Solomon, B., Koppel, R., Frankel, D., and Hanan-Aharon, E. "Disaggregation of Alzheimer β -amyloid by site-directed mAb" Proc Natl Acad Sci EUA 1997. 94:4109-4112.
13. Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R.-L., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Lieberburg, I., Motter, R., Nguyen, M., Soriano, F., Vasquez, N. Weiss, K., Welch, B., Seubert, P., Schenk, D., and Yednock, T. "Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease" Nature Medicine 2000. 6:916-919.
14. Gargano, N., and Catteno, A. "Inhibition of murine leukemia virus retrotranscription by the intracellular expression of a phage-derived anti-reverse transcriptase antibody fragment". J Gen Virol 1997. 78:2591-2599.
15. Frenkel, D. Solomon, B., and Benhar, I., "Modulation of Alzheimer's β -amyloid neurotoxicity by site-directed single-chain antibody" J Neuroimmunol 2000. 106:23-31.
16. Lecerf, J.-M., Shirley, T. L., Zhu, Q., Kazantsev, A., Amersdorfer, P., Housman, D. E., Messer, A., and Huston, J.S. "Human single-chain Fv intrabodies counteract in situ hunting aggregation in cellular models of Huntington's disease" Proc Natl Acad Sci EUA 2001. 98:4764-4769.
17. Gouras, G.K., Tsai, J., Naslund, J., Vincent, B., Edgar, M., Checler, F., Greenfield, J. P., Haroutunian, V., Buxbam, J.D., Xu, H., Greengard, P., and Relkin, N.R. "Intraneuronal A β 42 accumulation in human brain". Am J Pathol 2000. 156:15-20.
18. Poul, M.-A., Becerril, B., Nielsen, U. B., Morrison, P., and Marks, J.D. "Selection of tumor-specific internalizing human antibodies from phage libraries". J Mol Biol 2000. 301:1149-1161.
19. Gevorkian, G., Manoutcharian, K., Almagro, J. C., Govenzensky, T., and Dominguez, V. "Identification of autoimmune thrombocytopenic purpura-related epitopes using phage display peptide library". Clin Immunol Ummunopathol 1998. 86:305-309.

20. Manoutcharian, K., Sotelo, J., Garcia, E., Cano, A., and Gevorkian, G. "Characterization of cerebrospinal fluid antibody specificities in neurocysticercosis using phage display peptide library". *Clin Immunol* 1999. 91:117-121.
21. Gevorkian, G., Manoutcharian, K., Govezensky, T., Cano, J. A., Dominguez, V., Santamaria, H., and Larralde, C. "Identification of mimotopes of platelet autoantigens associated with autoimmune thrombocytopenic purpura". *J Autoimm* 2000; 15:33-40.
22. Merrifield, R.B. "Solid phase peptide synthesis. The synthesis of a tetrapeptide". *J Am Chem Soc* 1963. 85:2149-2154.
23. El-Agnaf, O.M.A., Mahil, D.S., Patel, B.P., and Austen B.M. "Biochemical and Biophysical Research Communications 2000. 273;1003-1007.
24. Huang, T.H.J., Yang, D.S., Plaskos, N.P., Go, S., Yip, C.M., Fraser, P.E., and Chakrabarty A. "Structural studies of soluble oligomers of the Alzheimer β -amyloid peptide". *J Mol Biol* 2000. 297;73-87.
25. Klein, W.L., Kraft, G.A., Finch, C.E., "Targeting small A β oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum?". *Trends in Neurosciences* 2001. 24;219-224.
26. Janeway, C.A., Travers, P., Hunt, S., Walport, M., 1997. "Immunobiology" 3rd edition. Garland Publishing. EUA. Chap 7.
27. Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD and Winter G. "Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage". *J Mol Biol* 1991. 222:581-597.
28. Hoogenboom HR and Winter G. "Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro". *J Mol Biol* 1992. 227:381-388.
29. Stemmer WPC, Cramer A, Ha KD, Brennan TM, and Heyneker HL. "Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides". *Gene* 1995. 164:49-53.
30. Griffiths AD, Williams SC, Hartley O, Tomlinson IM, Waterhouse P, Crosby WL, Kontermann RE, Jones PT, Low NM, Allison TJ, Prospero TD, Hoogenboom HR, Nissim A, Cox JPL, Harrison JL, Zaccolo M, Gherardi E, and Winter G. "Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires". *EMBO* 1994. 13:3245-3260.
31. Yang WP, Green K, Pinz-Sweeney S, Briones AT, Burton DR and Barbas III CF. "CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range". *J Mol Biol* 1995. 254:392-403.

32. Soderlind E, Vergeles M and Borrebaeck CAK. "Domain libraries: synthetic diversity for de novo design of antibody V-regions". *Gene* 1995. 160: 269-272.
33. Burton DR and Barbas III CF. "Human antibodies to HIV-1 by recombinant DNA methods". *Chem Immunol* 1993. 56:112-126.
34. Johnson KS and Chiswell DJ. "Human antibody engineering". *Curr Opin Struct Biol* 1993.3:564-571.
35. Chowdhury P, Viner JL, Beers R, Pastan I. 1998. Isolation of a high-affinity stable single-chain Fv specific for mesothelin from DNA-immunized mice by phage display and construction of a recombinant immunotoxin with anti-tumor activity. *Proc Natl Acad Sci* 95: 669-674.
36. Iannolo G, Minenlova O, Petruzzelli R, Cesareni G. 1995. Modifying filamentous phage capsid: limits in the size of the major capsid protein. *J Mol Biol* 248:835-844.
37. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G and Chiswell DJ. "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains". *Nature* 1990. 348:552-554.
38. Marks JD, Tristem M, Karpas A and Winter G. "Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family specific oligonucleotide probes". *Eur J Immunol* 1990. 27:985-991.
39. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE and Hoogenboom HR. "Making antibodies by phage display technology". *Annu Rev Immunol* 1994. 12:433-55.
40. Kruif J, Boel E and Logtenberg T. "Selection and application of human single chain Fv antibody fragments from a semi-synthetic phage antibody display library with designed CDR3 regions". *J Mol Biol* 1995. 248:97-105.
41. Fu Y, Shearing LN, Haynes S, Crewther P, Tilley L, Anders R and Foley M. "Isolation from phage display libraries of single chain variable fragment antibodies that recognize conformational epitopes in the malaria vaccine candidate, apical membrane antigen-1". *J Biol Chem* 1997. 272:25678-25684.
42. Kalinke U, Krebber A, Krebber C, Bucher E, Pluckthun A, Zinkernagel RM and Hengartner. "Monovalent single-chain Fv fragments and bivalent miniantibodies bound to vesicular stomatitis virus protect against lethal infection". *Eur J Immunol* 1996. 26:2801-2806.
43. Pini A, Viti F, Santucci A, Carnemolla B, Zardi L, Neri P and Neri D. Design and use of a phage display library. *J Biol Chem* 1998. 273:21769-21776.