



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización de dos anticuerpos monoclonales (4D5 y 4G11) anti-A β pE11-42

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA:

QFB. Gilberto Adrian Rodríguez López

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Gohar Gevorgyan

[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Rocío Salceda Sacanelles

[Instituto de Fisiología Celular](#)

Dr. Enrique Ortega Soto

[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Ciudad de México. Abril, 2022



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.

Índice.

Dedicatoria	5
Agradecimientos.....	6
Abreviaturas.	7
Resumen.....	8
Introducción.....	9
Enfermedad de Alzheimer.....	9
Epidemiología	9
Síntomas.....	10
Diagnostico	10
Factores de Riesgo.....	11
Neuropatología	12
Macroscópica.....	12
Microscópica.....	13
Patología de tau.....	15
Placas amiloides.....	15
Procesamiento APP.....	16
Hipótesis de la cascada amiloide.....	18
Especies A β piroglutamadas (A β pE) y A β pE11-42.....	21
Tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer.....	23
Inmunoterapia anti-A β	24
Inmunoterapia activa anti-A β	25
Inmunoterapia pasiva anti-A β	26

Antecedentes	29
Justificación.....	30
Objetivo General	31
Objetivos particulares.....	31
Metodología.....	32
Péptidos y compuestos químicos.....	32
Mapeo de Epítomos de 4G11 mediante ELISA	32
Western Blot para detectar las diferentes formas de A β sintético con AcMo 4G11.	33
Mapeo de epítomos utilizando bibliotecas de péptidos desplegados en fagos filamentosos.....	33
Bioselección (Biopanning)	34
Amplificación de Fagos.....	34
Titulación de partículas virales.....	35
Aislamiento de clonas positivas	35
ELISA para la selección de clonas positivas.....	36
Purificación de ADN viral de cadena sencilla.....	36
Secuenciación del material genético de los Fagos	37
Resultados	38
El anticuerpo AcMo 4G11 no reconoce ningún fragmento de las regiones amino, central y carboxilo del péptido A β	38
Reconocimiento de diferentes formas de A β por el AcMo 4G11.....	39
Mapeo de epítomos del AcMo 4D5 utilizando biblioteca de heptapéptidos desplegados en fago filamentoso M13.....	40
Mapeo de epítomos del AcMo 4G11 utilizando biblioteca de heptapéptidos desplegados en fago filamentoso M13.....	44

Discusión.....	46
Conclusiones.....	50
Perspectivas.....	51
Referencias	52

Dedicatoria

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por inculcarme el espíritu de superación, por los más de 9 años de educación que me ha brindado y por permitirme ser parte de esta grandiosa comunidad.

A la Doctora Gohar Gevorgyan por su apoyo académico y asesoramiento en la realización del presente trabajo.

Al Biol. Exp. Gonzalo Asariel Acero Galindo por su asesoramiento técnico durante la realización de mi proyecto.

A mi comité tutorial por su tiempo y valiosa cooperación en la realización del proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, por su apoyo y enseñanza adquirida día a día.

Investigación realizada gracias al proyecto DGAPA-PAPIIT IN203319

Abreviaturas.

- 5HT Serotonina
- Ach Acetilcolina
- AcMo Anticuerpo monoclonal
- ADAM Desintegrina y metaloproteasa
- AICD Dominio intracelular de la proteína precursora amiloide
- APA Aminopeptidasa A
- APH-1 Proteína faringe anterior defectuosa
- APOE Apolipoproteína E
- APP Proteína precursora amiloide
- ARIA Anormalidades en imagenología relacionadas a amiloides
- A β Beta amiloide
- CTF Fragmento C-terminal
- DPP Dipeptidil peptidasa
- EA Enfermedad de Alzheimer
- EAFIP Enfermedad de Alzheimer familiar de inicio temprano
- EAIT Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío
- EP2 Potenciador de presenilina 2
- GC Glutaminil ciclasa
- GFAP Proteína ácida fibrilar
- HRP Peroxidasa de rábano picante
- NE Norepinefrina
- NFT Marañas neurofibrilares
- NMDA N-metil-D-aspartato
- PBS Amortiguador de fosfatos salino
- PET Tomografía por emisión de positrones
- PHF Filamentos helicoidales pareados
- PSEN Presenilina
- PVDF Flupruro de polivinilideno
- ROS Especies reactivas de oxígeno
- TACE Enzima convertidora del factor de necrosis tumoral
- TBS Amortiguador de tris salino
- UFP Unidades formadoras de placa
- FDA Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

Resumen.

La enfermedad de Alzheimer (EA), una de las causas de demencia más común, es una patología crónico-degenerativa inhabilitante que cada vez está más presente en la población humana. Esto debido a un aumento en la esperanza de vida y al crecimiento de la incidencia de comorbilidades que incrementan el riesgo de padecer esta enfermedad. Los tratamientos actuales de la EA se basan en un régimen sintomático y no disminuyen la progresión de la enfermedad, por lo que es de vital importancia continuar con la búsqueda de medicamentos que logren modificar el curso de la enfermedad. La inmunoterapia anti-A β , péptido responsable de los fenómenos patológicos característicos de la EA, es una de las estrategias más prometedoras para el tratamiento de la EA, ya que es apoyada por la reciente aprobación de aducanumab, un anticuerpo humanizado anti-A β . Además, se han investigado otros blancos terapéuticos como las especies N-truncadas y piroglutamadas de A β , que tienen una mayor correlación con la severidad de EA y fenómenos patológicos en el cerebro.

En el presente trabajo se realizó la caracterización de dos anticuerpos monoclonales murinos anti-A β pE11-42 (4D5 y 4G11), los cuales, a pesar de haber sido obtenidos ocupando el mismo péptido, presentan características diferentes. En primer lugar, se encontró que el anticuerpo monoclonal (AcMo) 4D5 reconoce el motivo FFY(A)ED de los aminoácidos 19-23 de A β , lo que explica su reactividad cruzada con el péptido A β 1-42 y las especies piroglutamadas (A β pE11-42 y A β pE3-42). Por otro lado, se determinó que el AcMo 4G11 reconoce específicamente el péptido A β pE11-42, que el epítipo es de tipo conformacional lo suficientemente complejo para no ser reproducido con heptapéptidos desplegados en fagos filamentosos y, además, que la presencia del piroglutamato es necesario para el reconocimiento por parte de 4G11. Por último, se encontró que ambos AcMo reconocen diferentes formas de oligómeros del péptido A β .

Con todo esto podemos concluir que 4D5 y 4G11 son candidatos de interés para ser parte de futuros protocolos terapéuticos o de diagnóstico para la EA.

Introducción.

Enfermedad de Alzheimer.

La EA es una enfermedad neurodegenerativa irreversible, progresiva e inhabilitante. Además, es la causa más común de demencia llegando hasta el 80% de los casos diagnosticados a nivel mundial (Crous-Bou et al., 2017). Debido a que la edad es el principal factor de riesgo, su prevalencia es mayor en adultos mayores a 65 años. Clínicamente se presenta como una demencia progresiva que predominantemente afecta la memoria episódica (Tellechea et al., 2018). La EA se clasifica en dos tipos de acuerdo con la edad en la que se presenta: esporádica o de inicio tardío (EAIT) y familiar o de inicio precoz (EAFIP). El 95% de los casos de EA son de tipo esporádico y ocurren en personas mayores a 65 años, mientras que la EAFIP ocurre de manera temprana, estableciéndose antes de los 65 años, en alrededor del 5% de los casos diagnosticados y tiene una base genética (Calderon & Duyckaerts, 2018).

Epidemiología.

En 2015 se estimó que, a nivel mundial, alrededor de 47 millones de personas tenían demencia, de los cuales aproximadamente del 60% al 80% de los casos se atribuyeron a la EA (Alzheimer's Association, 2020). Norteamérica y el occidente de Europa, son las regiones con la mayor prevalencia, seguidas de Latinoamérica, China y los países del oeste del pacífico (Reitz & Mayeux, 2014), con una prevalencia en continuo crecimiento debido al envejecimiento de la población a nivel mundial, volviéndose una carga socioeconómica en temas de salud pública (Crous-Bou et al., 2017). Se estima que para el 2050 el número de casos ascenderá a más de 150 millones de pacientes (Alzheimer's Association, 2019).

Síntomas.

Puede haber una gran heterogeneidad en cuanto al desarrollo y progresión de los síntomas y déficit clínico en la EA, siendo en etapas tempranas muy sutil la diferencia entre los cambios cognitivos relacionados con la edad y la EA (Atri, 2019). Además de la pérdida de la memoria característica de los pacientes con EA se presentan otros múltiples síntomas que cambian con el paso de los años, los cuales reflejan el nivel de daño de las neuronas en diferentes partes del cerebro. Las personas pueden presentar dificultad en el desempeño de sus actividades cotidianas, episodios de confusión y divagación, además de tener cambios de personalidad y comportamiento (Alzheimer's Association, 2019). En etapas severas los pacientes requieren asistencia para realizar sus actividades básicas y eventualmente pierden la habilidad para comunicarse. Es en esta etapa en donde el daño a la salud física de la persona empieza a ser evidente. Debido al daño en áreas del cerebro relacionadas con el movimiento, el paciente queda postrado en cama generando lesiones en la piel que llegan a terminar en infecciones o hasta sepsis, lo que inicia un estado inflamatorio general que resulta en una falla en múltiples órganos. Cuando el daño es en áreas relacionadas con la función de deglución se dificulta el proceso de comer y beber del individuo, pudiendo asirar partículas de comida que llegan a los pulmones causando una infección denominada neumonía aspirativa, que contribuyendo a la causa de muerte de los individuos con EA (Alzheimer's Association, 2019).

Diagnóstico

El diagnóstico de la EA es un proceso complejo y no existe una prueba única que permita llevar a cabo la evaluación, por lo que debe realizarlo un equipo multidisciplinario (Alzheimer's Association, 2020).

Uno de los primeros pasos es obtener el historial clínico del paciente y de la familia del individuo. El cuestionamiento se puede realizar al paciente o a otro informante independiente, debido al deterioro cognitivo en el que se llegara a encontrar el paciente (Alzheimer's Association, 2020). Además, se debe realizar una evaluación física y neurológica, a pesar de que una evaluación neurológica es irrelevante en la EA en etapas tempranas. Posteriormente, se realiza una evaluación cognitiva en la que el especialista realiza un examen de la cognición global, además de la evaluación de la memoria episódica, de las actividades de la vida diaria, el comportamiento y los síntomas psiquiátricos (Waldemar & Burns, 2017).

En algunas circunstancias se hace uso de imagenología de tomografía por emisión de positrones (PET) del cerebro en busca de altos niveles de beta amiloide ($A\beta$), así como pruebas serológicas o punción lumbar para determinar los niveles de $A\beta$ en líquido cefalorraquídeo, pueden ser ocupados como exámenes complementarios que sugieran que la EA es la causa de la demencia (Alzheimer's Association, 2020).

Para un diagnóstico definitivo de la EA se debe de realizar un examen microscópico histopatológico post-mortem del cerebro, el cual revele depósitos de dos tipos de agregados proteicos: depósitos extracelulares de $A\beta$ en el parénquima y depósitos intraneuronales de la proteína tau en forma de marañas neurofibrilares (Waldemar & Burns, 2017).

Factores de Riesgo.

Actualmente la EA es considerada una patología multifactorial, y al igual que otras enfermedades crónicas, se desarrolla como resultado de la interacción de diferentes factores, a excepción de la EAFIP, la cual es ligada a mutaciones autosómicas dominantes. A pesar de esto, la edad es, sin duda, uno de los mayores factores de riesgo. Como se hace notar anteriormente, el porcentaje de individuos con demencia debida a la EA se incrementa drásticamente con la edad, siendo el 3%

en personas de 65-74 años, 17% en personas de 75-84% y 32% en personas mayores a 85 años (Alzheimer's Association, 2020).

En cuanto a la base genética, uno de los genes a los que se le ha asociado con el desarrollo de la EAIT es el alelo 4 de la apolipoproteína E (APOE-4). Por otro lado, se han identificado varias mutaciones que son responsables del desarrollo de la EAFIP, las cuales principalmente se albergan en 3 genes; en la proteína precursora amiloide (APP), la presenilina 1 (PSEN1) y la presenilina 2 (PSEN2). La transmisión de estas mutaciones, identificadas hasta el momento, siguen una herencia autosómica dominante. Debido a que también se ha asociado al establecimiento de la EAFIP con la dosis génica, aquellos individuos con síndrome de Down tienen un mayor riesgo de desarrollar EA relacionado a la trisomía 21, en el cual se encuentra el gen que codifica para la APP (Alzheimer's Association, 2020; Kim et al., 2014).

Además de los factores ya mencionados, los cuales no pueden ser alterados, existe una serie de factores de riesgo que pueden ser modificables y están completamente relacionados con el estilo de vida. Los pacientes con EA presentan comorbilidad con otras enfermedades crónicas como la hipertensión, dislipidemia, síndrome metabólico y obesidad, diabetes y riesgos vasculares, los cuales incrementan el riesgo de padecer EA (Alzheimer's Association, 2020). En cambio, la actividad física, el ejercicio, la preparación educativa y la inteligencia son factores relacionados con hábitos y estilo de vida los cuales disminuyen el riesgo a padecer EA (Atri, 2019).

Neuropatología.

Macroscópica.

Mientras ciertos rasgos de la EA pueden verificarse en una examinación macroscópica del cerebro mediante estudios de imagen, ninguna característica o combinación de éstas es específica; pero algunas pueden sugerir fuertemente el

padecimiento de la EA (DeTure & Dickson, 2019). El patrón típico, observado en cerebros obtenidos post mortem, es una atrofia simétrica predominantemente afectando los lóbulos temporales mediales y escasamente en las cortezas somatosensoriales (Serrano et al., 2011). Las cortezas frontal y temporal frecuentemente tienen un alargamiento de su espacio surcal con una atrofia del giro (pliegues estructurales que se observan en la corteza cerebral), mientras que las cortezas primarias motoras, sensoriales y visuales no se encuentran (Figura 1). Hay un incremento en la atrofia en áreas corticales posteriores, más notablemente en el precúneo y en el giro cingulado posterior (DeTure & Dickson, 2019). Como resultado del adelgazamiento cortical, los ventrículos laterales se encuentran dilatados particularmente en los cuernos laterales, además se presenta una disminución en el peso del cerebro. Se presenta también una atrofia medial temporal afectando la amígdala y el hipocampo, usualmente acompañado de un alargamiento de los cuernos temporales, lo que sugiere el desarrollo de la EA (DeTure & Dickson, 2019; Serrano et al., 2011). La angiopatía amiloide severa puede estar asociada con una leucoencefalopatía, que resulta en pequeños microinfartos corticales, desmielinización de la materia blanca periventricular y pequeñas microhemorragias lobulares (Serrano et al., 2011).

Microscópica.

De manera microscópica los rasgos característicos de la EA son la presencia anormal de agregados proteicos en el cerebro. Estas manifestaciones generan dos lesiones patológicas de la EA. La primera lesión se presenta como acumulaciones densas extracelulares del péptido A β el cual forma placas que son denominadas placas amiloides. La segunda son agregados intracelulares de la proteína tau fosforilada, dicha lesión es conocida como marañas neurofibrilares. La presencia de ambas patologías es requerida para un diagnóstico categórico de la EA (Lewis & Spillane, 2019).

Además de lo anterior, también puede observarse la presencia de gliosis que implica la hipertrofia de astrocitos que han incrementado su expresión de la proteína ácida fibrilar (GFAP), junto con un incremento de células de la microglía en la materia gris cercana a las lesiones patológicas de la EA (Lewis & Spillane, 2019).

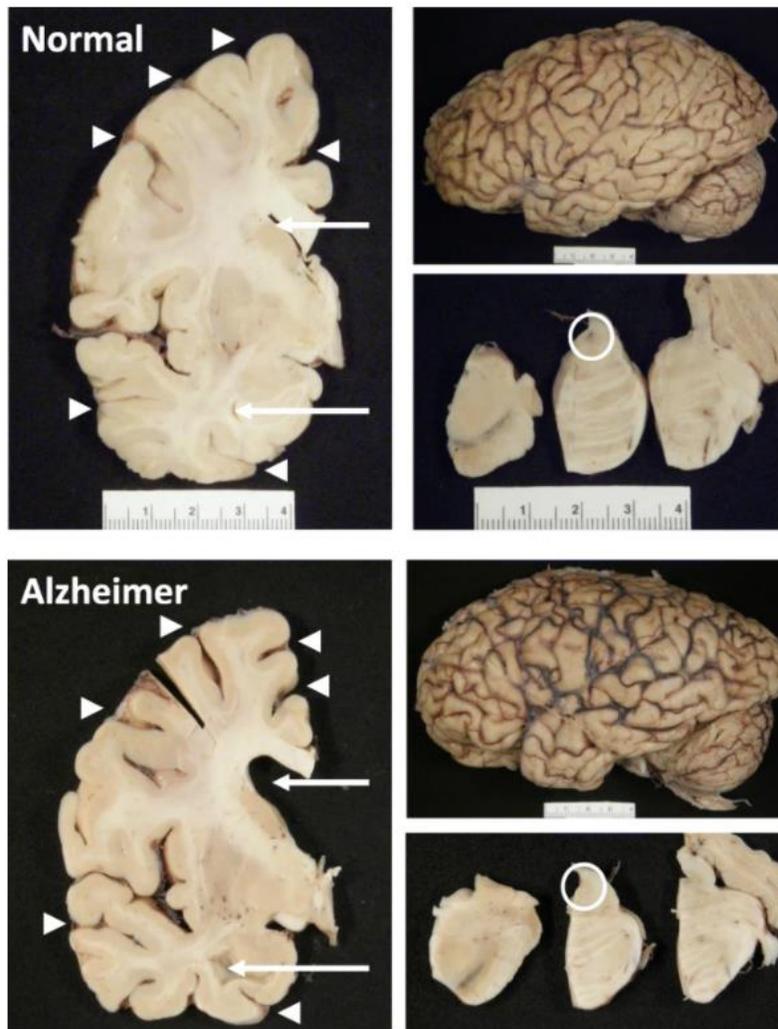


Figura 1. Neuropatología de la EA. Vista lateral de un cerebro con EA donde se muestran los espacios surcales y el estrechamiento del giro comparado con un cerebro normal. En secciones coronales las puntas de flechas indican la atrofia cerebral que es acompañada por un alargamiento de los cuernos frontales y temporales de los ventrículos laterales. Tomada de (DeTure & Dickson, 2019).

Patología de tau.

La proteína tau pertenece a la familia de las proteínas asociadas a microtúbulos. Esta proteína es sometida a fosforilaciones o acetilaciones para desempeñar su función fisiológica. Está localizada principalmente en los axones, pero también se encuentra en las sinapsis y es necesaria para el transporte de proteínas reguladoras del receptor de glutamato. Sin embargo, en estados patológicos la proteína tau está hiperfosforilada desensamblándose de los neurotúbulos, provocando su desestabilización y posterior despolimerización. Una vez que la proteína tau hiperfosforilada se libera al cuerpo celular, ésta sufre un plegamiento aberrante a una estructura β -plegada, posteriormente se polimeriza en filamentos helicoidales pareados (PHF) y eventualmente en marañas neurofibrilares (NFT). Las NFT son inclusiones globulares formadas por dos filamentos helicoidales pareados, que se desarrollan en el cuerpo, las dendritas y los axones de las neuronas. Las neuronas más propensas en desarrollar marañas neurofibrilares son las neuronas piramidales del hipocampo, la corteza entorrinal y la corteza cerebral, al igual que las neuronas multipolares de la región subcortical que se proyectan directamente a la corteza. Esta acumulación de tau hiperfosforilada genera una disminución de la plasticidad sináptica, un déficit en el citoesqueleto y bloquea el transporte intraneural (Calderon & Duyckaerts, 2018).

Placas amiloides.

Las placas amiloides, también conocidas como placas seniles, son acumulaciones o depósitos extracelulares de péptidos hidrofóbicos de $A\beta$ de entre 38 y 43 aminoácidos de largo derivados de un proceso proteolítico (Farooqui, 2017c). Estos depósitos son detectados por inmunohistoquímica usando anticuerpos como 4G8 o 6F/3D. Dentro de las especies de $A\beta$ la isoforma $A\beta$ 1-40 es la más abundante en circulación, pero la especie $A\beta$ 1-42 es la que se encuentra en mayor proporción en las placas seniles, esto debido a que es menos soluble y más propensa a formar

fibrillas (Calderon & Duyckaerts, 2018). Con un criterio morfológico es posible clasificar a las placas amiloides en dos tipos: placas difusas y placas compactas basado en su tinción con colorantes específicos para la conformación de β -plegada como, por ejemplo, rojo congo y tioflavina-S. Las placas compactas están compuestas por una masa central de fibrillas extracelulares que se van extendiendo radialmente hacia la periferia donde se van mezclando con procesos neuronales, astrocíticos y microgliales. Se caracterizan por ser positivos a tinciones con rojo congo y tioflavina-S y son asociados a respuestas inflamatorias (Calderon & Duyckaerts, 2018). Por otro lado, las placas difusas son depósitos amorfos negativos a tinción con Rojo Congo y Tioflavina-S, generalmente no son neuríticos ni se les relaciona con gliosis o pérdida sináptica y su presencia es frecuente en cerebros de pacientes cognitivamente estables (Calderon & Duyckaerts, 2018).

Procesamiento de la APP.

El péptido $A\beta$ es el producto del procesamiento de la APP, la cual es una glicoproteína transmembranal de tipo 1, cuya función no es totalmente clara, pero se le ha atribuido un papel en la modulación de la neurogénesis, la plasticidad sináptica y la neurotransmisión. Su proteólisis puede ocurrir por dos vías, la vía amiloidogénica y la vía no amiloidogénica (Figura 2). La mayoría de las veces la APP es procesada por la vía no amiloidogénica, la cual no lleva a la producción de $A\beta$. El procesamiento es iniciado por dos endopeptidasas llamadas α y β secretasa. El corte por los complejos protéicos α -secretasa o β -secretasa resulta en la liberación del ectodominio completo, generando largos derivados de APP solubles ($APPs\alpha$ y $APPs\beta$) junto con la producción de un fragmento C-terminal embebido en la membrana llamado α CTF o β CTF (C83 y C99, respectivamente). El procesamiento de CTF por γ -secretasa genera el péptido inofensivo P3 (por la vía no amiloidogénica) o péptidos $A\beta$ (vía amiloidogénica) de un rango de 38 a 43 aminoácidos, junto con el dominio intracelular de la proteína precursora amiloide (AICD) (Farooqui, 2017b). En realidad, α -secretasa se conforma por una familia de

enzimas proteolíticas de las cuales es la desintegrina y metaloproteasa 10 (ADAM10) la principal en cortar APP, mientras que la enzima cortadora de APP en el sitio β 1 (BACE1) es aquella que realiza la función de β -secretasa. En cambio, γ -secretasa es un complejo multiprotéico compuesto por nicastrina, la proteína faringe anterior defectuosa (APH-1), el potenciador de presenilina 2 (EP2) y PSEN1/2, las cuales son las subunidades encargadas de la actividad catalítica del complejo (Bergström et al., 2016).

Se han descrito otras vías no amiloidogénicas por las que se generan fragmentos de péptidos solubles de menor tamaño derivados de A β en las cuales participan varias metaloproteasas como, TACE/ADAM17 y ADAM9, que pueden hidrolizar la APP en el sitio de α -secretasa dentro del dominio de A β , evitando así la formación del péptido A β completo (Farooqui, 2017b).

El incremento en los niveles de A β puede ser causado por: (1) un incremento en la producción de A β debido a mutaciones en la APP o mutaciones en genes que tengan que ver con su procesamiento (PSEN1, PSEN2), en el caso de la EAFIP; o (2) debido a una disminución en la eliminación de A β en el caso de la EAIT (Farooqui, 2017b).

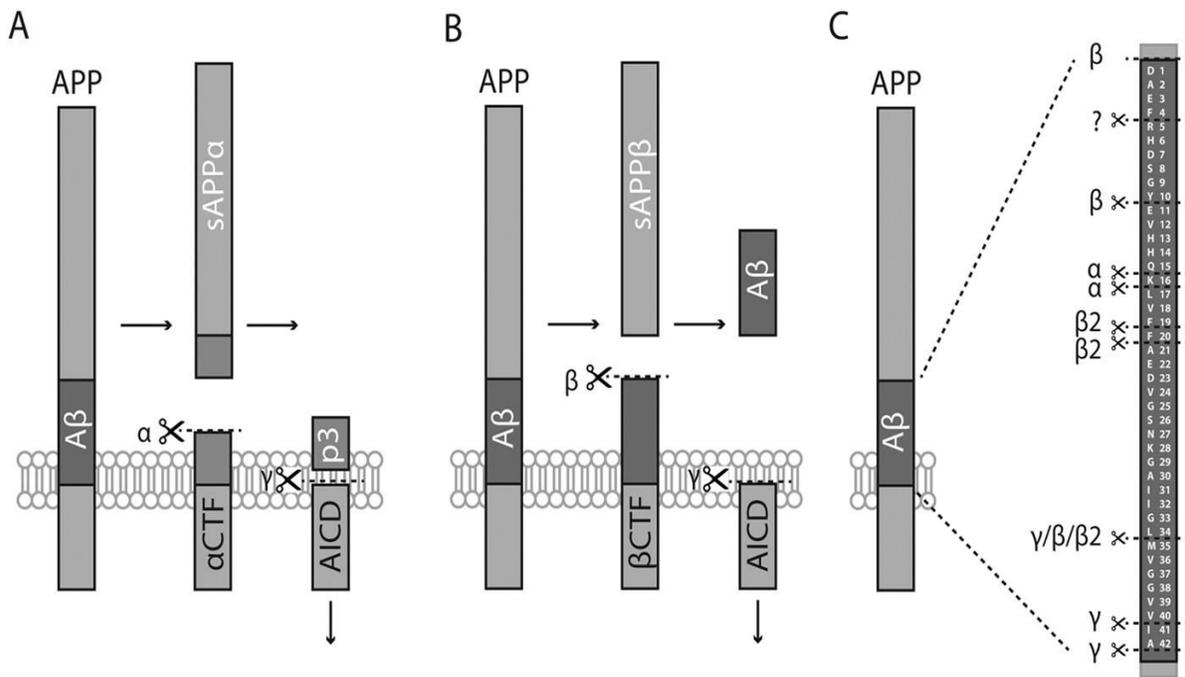


Figura 2. Diagrama del procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP). La APP es cortada por la α-secretasa y γ-secretasa por la vía no amiloidogénica (A). Por otro lado, en la vía amiloidogénica (B) la APP es cortada por la β-secretasa y γ-secretasa, dando origen al péptido Aβ. En (C) se muestran los diferentes sitios donde actúan las enzimas capaces de realizar un corte dentro de la región de Aβ en la APP. Tomada de (Bergström et al., 2016).

Hipótesis de la cascada amiloide.

La hipótesis de la cascada amiloide postula que la neurodegeneración en la EA es causada principalmente por la acumulación anormal de placas de Aβ en diferentes regiones del cerebro. De acuerdo con esta hipótesis la acumulación del péptido Aβ actúa como un gatillo que activa una cascada de eventos patológicos (Figura 3) que incluyen formación de agregados amiloides neurotóxicos, activación de la microglía y astrocitos, incremento en la liberación de citocinas proinflamatorias, daño neurítico y disfunción sináptica, alteración en la actividad de cinasas y fosfatasa; y por último formación de marañas neurofibrilares. Toda esta serie de eventos culmina con una disfunción y pérdida neuronal (Farooqui, 2017b).

Evidencias genéticas, bioquímicas y patológicas apoyan esta hipótesis que afirma que la acumulación de placas amiloides es la causa primaria de la patología. Las

alteraciones en la producción y eliminación de A β resultan en la acumulación de A β 1-40 y A β 1-42, o una inversión en la proporción de producción de especies de A β favoreciendo a la especie de mayor tamaño. Estos se acumulan formando oligómeros que pueden tener un impacto tóxico directo, pero también pueden llevar a una disfunción de cinasas y fosfatasas que da como resultado la hiperfosforilación de tau provocando el desensamble de los microtúbulos. Eso lleva a la formación de NFT, generando especies tóxicas de agregados de tau que culminan en citotoxicidad (Lewis & Spillane, 2019). La formación de depósitos de A β y difusión de las placas llevan a una activación local de la microglía, liberación de citocinas, astrogliosis y a una respuesta proinflamatoria multiprotéica. Los procesos inflamatorios pueden magnificar y exacerbar la muerte celular iniciada por la exposición a agregados proteicos. Además, estos depósitos de A β llevan a diferentes cambios estructurales y bioquímicos en axones, dendritas y cuerpos neuronales vecinos, que generan la pérdida sináptica, neuronal y atrofia cerebral característica de la EA (Barage & Sonawane, 2015). Es importante notar que, a pesar de las evidencias que se tienen, aún existen vacíos en nuestro entendimiento sobre cómo se unen los eventos que forman la hipótesis de la cascada amiloide.

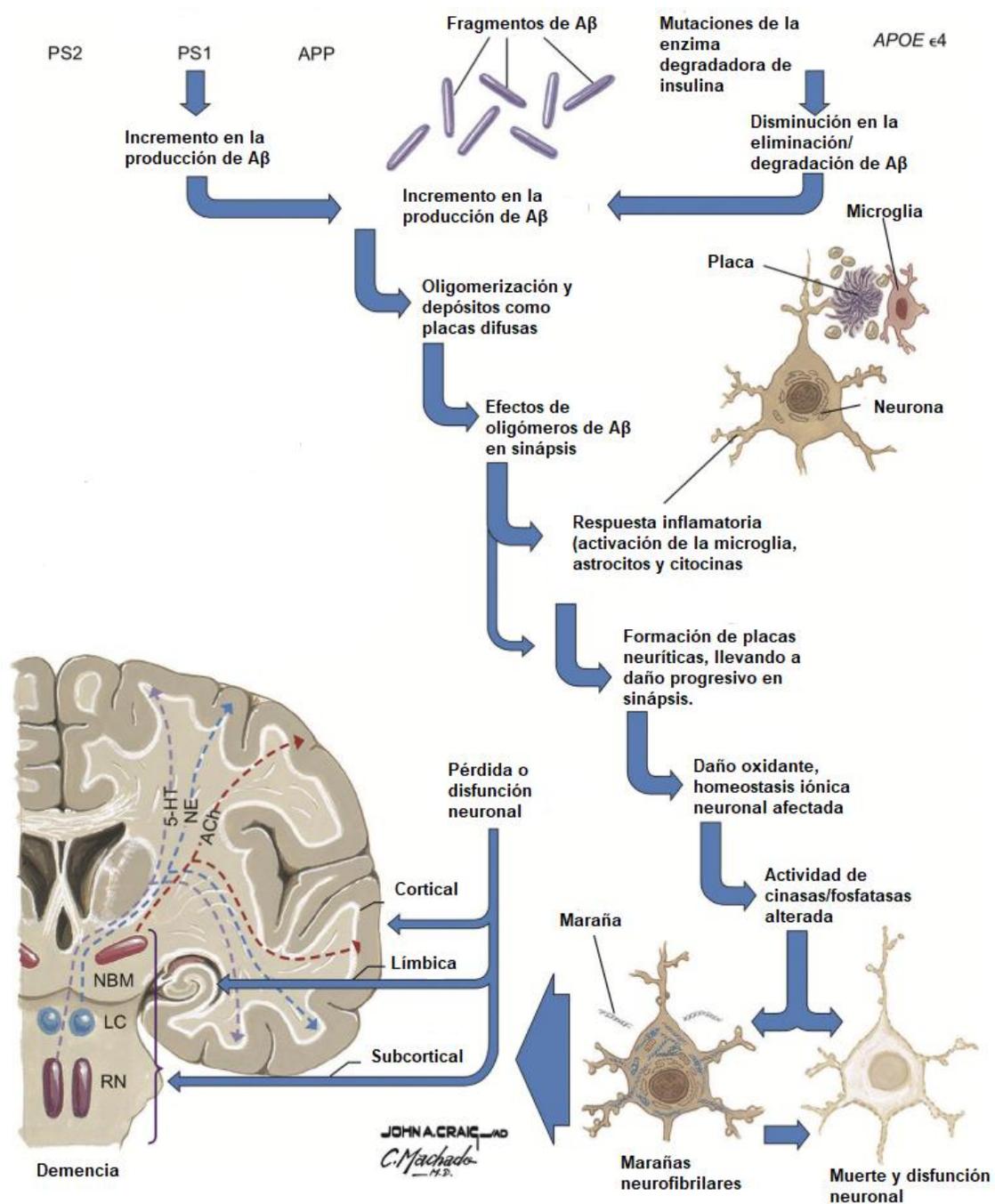


Figura 3. Diagrama de la hipótesis de la cascada amiloide. La hipótesis establece que la acumulación de Aβ en el cerebro resulta en la generación de agregados oligoméricos de este péptido. De esta manera provoca la agregación de tau, llevando a citotoxicidad y neurodegeneración. La disfunción neuronal se manifiesta como una disminución de los neurotransmisores de serotonina (5HT), norepinefrina (NE) y acetilcolina (ACh). Modificada de (Lewis & Spillane, 2019).

Especies A β piroglutamadas (A β pE) y A β pE11-42.

El papel de A β 1-42 en la etiología de la EA se ha descrito exhaustivamente, cuyos oligómeros solubles llevan a la neurotoxicidad, neurodegeneración y eventualmente al déficit cognitivo. Sin embargo, la población de péptidos A β consiste realmente de varias especies relacionadas al péptido A β , las cuales colectivamente representan una familia heterogénea de péptidos hidrofóbicos de 30-42 aminoácidos (Dunys et al., 2018). Existe evidencia que otras isoformas de A β funcionan como agentes neurotóxicos subyacentes en la degeneración celular, inflamación y deterioro cognitivo (Dunys et al., 2018). Estos catabolitos pueden ser obtenidos mediante el procesamiento primario de enzimas en β APP o debido al procesamiento secundario de A β por exopeptidasas (Gunn et al., 2010).

La existencia de estas especies subyacentes a las formas convencionales ha llamado la atención de la investigación científica, por lo que se han invertido esfuerzos en determinar el papel en la patogenicidad en la EA de las especies modificadas post-traduccionalmente, como las especies piroglutamadas, para su posible aplicación como blancos terapéuticos y biomarcadores.

La generación de estas especies piroglutamadas se puede dividir en dos pasos, 1) la generación de la especie aminotruncada y 2) la ciclación del aminoácido expuesto. Las especies aminotruncadas son formadas mediante la acción de especies reactivas de oxígeno (ROS) o la intervención de proteasas como la α -secretasa, BACE1/2 y otras exopeptidasas como la aminopeptidasa A (APA) y la familia de las dipeptidil peptidasas (DPP) (Dunys et al., 2018).

La especie A β 11-40/42 proviene del corte realizado por la enzima BACE1 en el sitio B', el cual es distinto al sitio en el que la enzima BACE1 corta para generar la especie completa (Dunys et al., 2018). Las especies aminotruncadas presentan un incremento en su hidrofobicidad, en comparación con la especie completa, debido a que pierden un cierto número de cargas: en el caso de A β 11-40/42 la pérdida es

de 6 cargas (Perez-Garmendia & Gevorkian, 2013). El péptido A β 11-40/42 expone en su extremo amino el residuo de ácido glutámico, el cual es blanco de la enzima glutaminil ciclasa (QC), formando la especie piroglutamada y cambiando sus propiedades fisicoquímicas. La QC es una acetil-transferasa la cual está ampliamente distribuida en el cerebro y se ha observado el incremento en su expresión en pacientes con EA (Gunn et al., 2010).

La piroglutamación de estas especies aminotruncadas cambia sus propiedades fisicoquímicas, por lo que se han identificado varias características que le brindan mayor toxicidad y estabilidad, mayor hidrofobicidad, mayor resistencia a aminopeptidasas, mayor facilidad de cambiar a la conformación β plegada, mayor facilidad de formación de oligómeros, una cinética más rápida de formación de fibrillas y, por último, un efecto semilla para la formación de placas amiloides (Gunn et al., 2010).

La importancia clínica de las especies A β pE radica en que se han encontrado selectivamente en pacientes con EA y en individuos con síndrome de Down (Gunn et al., 2010), además de ser considerados como la especie dominante de A β en el hipocampo y corteza de pacientes con EA (Alawode, et al., 2021). Aunado a esto se han encontrado regiones del cerebro con una mayor concentración de especies A β pE en comparación de la especie completa, lo cual sugiere que estas especies cumplen con un papel importante en la EA, principalmente en etapas tempranas (Gunn et al., 2010). Su resistencia a enzimas degradadoras contribuye a su poca eliminación y a su acumulación en el cerebro (Perez-Garmendia & Gevorkian, 2013). Finalmente, se ha determinado una correlación entre la presencia de A β pE3 con la severidad de la patología (Alawode et al., 2021). Por otro lado, el péptido A β pE11-42 ha sido encontrado como el péptido dominante en placas compactas en estudios de cerebros de individuos con EA, junto con su colocalización con la especie A β pE3-42 (Sullivan et al., 2011).

Con toda esta evidencia es clara la relevancia de las especies A β pE y su especificidad en estados patológicos, por lo que se ha sugerido que la

inmunoterapia de la EA debería tener en cuenta las especies piroglutamadas. Actualmente, la mayoría de las estrategias en desarrollo y ensayos clínicos están dirigidas al epítipo EFRH el cual está ausente en estas especies (Perez-Garmendia & Gevorkian, 2013).

Tratamiento de la EA.

Actualmente, los medicamentos aprobados para el tratamiento de la EA por la FDA son agentes sintomáticos, es decir, sólo se encargan de aliviar los síntomas que van presentando los pacientes, sin tener como objetivo el curar o retrasar el avance de la enfermedad. Estos medicamentos están comprendidos por rivastigmina, donapezil y galantamina (inhibidores de la colinesterasa); junto con la memantina (un antagonista no competitivo del receptor NMDA) (Tatulian, 2022).

Durante las primeras fases sintomáticas de la patología son utilizados los inhibidores de la acetilcolinesterasa, incrementando la transmisión colinérgica, lo que alivia temporalmente los síntomas cognitivos. Posteriormente, en etapas más severas de la EA, estos medicamentos son combinados con memantina, permitiendo disminuir la excitotoxicidad provocada por la liberación no controlada de glutamato. Cabe recalcar que ninguno de estos tratamientos tiene como blanco el origen molecular la EA (Patwardhan & Belemkar, 2021).

A pesar de llegar a alcanzar la Fase III de los estudios clínicos, diferentes compuestos no llegan a demostrar algún beneficio terapéutico en la disfunción cognitiva de la EA, por lo que se debe continuar con la investigación de estrategias novedosas que logren prevenir la progresión de la EA (Patwardhan & Belemkar, 2021).

Inmunoterapia anti-A β .

Una de las estrategias más prometedoras es la inmunoterapia, la cual tiene como objetivo reducir los niveles del péptido A β y así prevenir su acumulación o promover la eliminación de los agregados amiloides neurotóxicos. Actualmente, la investigación en inmunoterapia de la EA se enfoca en dos estrategias: la inmunización activa y la inmunización pasiva (Farooqui, 2017a). En la inmunización activa se administra el péptido A β con el fin de inducir los anticuerpos específicos. Por otro lado, en la inmunización pasiva se administran anticuerpos con un reconocimiento específico hacia el péptido A β . Sin embargo, en ambos casos tienen un papel importante anticuerpos capaces de mediar la disminución de agregados amiloides (Plotkin & Cashman, 2020). Sin embargo, mucho se ha cuestionado la efectividad de este tratamiento debido a la limitada penetración que tienen las moléculas de gran tamaño, como los anticuerpos, hacia el sistema nervioso central. Se ha estimado que <0.1% de las inmunoglobulinas en suero atravesará la barrera hematoencefálica. A pesar de esto, se ha observado que el pequeño porcentaje de anticuerpos que alcanzan su blanco terapéutico son capaces de permitir la fagocitosis del complejo A β -anticuerpo (Vander Zanden & Chi, 2020).

Sumado a esto se han propuesto diversos mecanismos por los cuales los anticuerpos anti-A β pueden actuar. El primero es prevenir la agregación y elongación de fibrillas “secuestrando” las especies de A β , el segundo es promover la eliminación de agregados amiloides mediada por la microglía, el tercero es bloquear el efecto tóxico de los oligómeros, y por último, cambiar el gradiente de transporte del péptido A β a través de la barrera hematoencefálica, que resulta en un incremento en el flujo del cerebro a la sangre periférica (Mantile & Prisco, 2020).

Inmunoterapia activa anti-A β .

AN1792 fue el primer tratamiento basado en la inmunización activa, el cual consiste en fibrillas de A β 42 como inmunógeno, junto con QS21 (saponina extraída de *Quillaja saponaria*) como adyuvante. Al realizar las pruebas clínicas, éstas tuvieron que ser detenidas debido a que, aproximadamente el 6% de los participantes desarrollaron síntomas de meningoencefalitis aséptica, provocada por la infiltración de células T anti-A β al cerebro (Tatulian, 2022). En el análisis post-mortem de los cerebros se observó la eliminación de placas de A β en la mayoría de los participantes sin tener una mejoría en los síntomas de demencia. Seguido de esto, se desarrolló una segunda generación de vacunas que, principalmente, dirigen la respuesta inmune al epítipo de células B sin generar una respuesta concomitante de células T contra el péptido A β . Cuatro miembros de esta generación llegaron a pruebas clínicas de fase II (CAD106, ACI-24, UB-211 y ABVac40) (Mantile & Prisco, 2020). Ninguna de estas vacunas ha generado meningoencefalitis aséptica en pruebas clínicas. Sin embargo, también ninguna ha reportado un beneficio clínico significativo, además de generar efectos adversos denominados como ARIA (anormalidades en imagenología relacionadas a amiloides) (Mantile & Prisco, 2020).

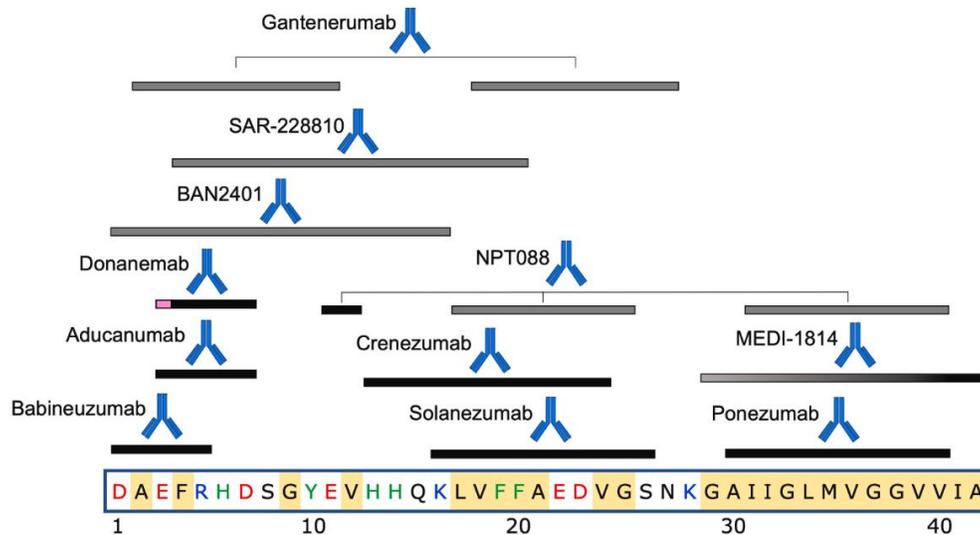


Figura 4. Diagrama de los epítomos que reconocen diferentes anticuerpos anti-Aβ. A lo largo de la investigación en inmunoterapia pasiva anti-Aβ, se han generado una variedad de anticuerpos con diferentes epítomos, siendo la mayoría contra la región N-terminal del péptido. Tomada de (Plotkin & Cashman, 2020).

Inmunoterapia pasiva anti-Aβ.

En paralelo al desarrollo de las estrategias de vacunación, también se han invertido muchos esfuerzos en la investigación de la inmunoterapia pasiva anti-Aβ la cual consiste en la administración de anticuerpos monoclonales. Esta permite evitar efectos adversos como la meningoencefalitis ocasionada por la activación de células T, observada en la inmunización activa. A pesar de que el uso de anticuerpos nos permite evadir ciertas respuestas inmunes, aún existe el riesgo de provocar reacciones inflamatorias en el cerebro, por lo que para minimizar esto se seleccionan anticuerpos con subclases de isotipos específicos, como por ejemplo IgG1 e IgG4, en lugar de IgG3, el cual tiene una función efectora más proinflamatoria debido a su mayor afinidad por los receptores de Fcγ y a C1q (Vander Zanden & Chi, 2020).

En dos décadas de investigación se han explorado diferentes epítomos del péptido Aβ (Figura 4) y se han desarrollado anticuerpos desde específicos a monómeros (solanezumab) hasta formas oligoméricas o fibrilares (bapineuzumab, crenezumab,

gantenerumab, lecanemab y aducanumab) (Tatulian, 2022). Sin embargo, generalmente estos agentes terapéuticos han fallado en alcanzar sus metas en la disminución del declive cognitivo o han sido detenidos por presentar efectos adversos como edemas y microhemorragias asociados a A β (ARIA-E y ARIA-H, respectivamente) (Tatulian, 2022; Vander Zanden & Chi, 2020).

Por mencionar un par de ejemplos de los anticuerpos anti-A β más relevantes se encuentra el caso de crenezumab, el cual es el primer anticuerpo desarrollado para reconocer específicamente a especies oligoméricas del péptido A β y su epítipo se encuentra en la región central del péptido A β 42 conformado, específicamente, por los aminoácidos 13-24 (Vander Zanden & Chi, 2020). Debido a que su subclase es una IgG4, crenezumab ha provocado una mínima respuesta inflamatoria secundaria, demostrando así, ser más seguro que otros anticuerpos en pruebas clínicas. Pese a haber probado ser más seguro, en 2019 fueron detenidas las pruebas clínicas de fase III debido a una falta de eficacia al modificar la EA (Tatulian, 2022; Vander Zanden & Chi, 2020).

Un segundo ejemplo es el de aducanumab, el cual tiene una gran selectividad por las especies agregadas de A β y se une a los aminoácidos 3-7 del péptido A β . A pesar de haber sido humanizado en una subclase IgG1, en pruebas clínicas se observó el desarrollo de edemas, principalmente en portadores del alelo ApoE4 y así en marzo del 2019, con los resultados de las pruebas de fase III, se determinó que el anticuerpo no era eficaz (Tatulian, 2022; Vander Zanden & Chi, 2020). Posteriormente, en octubre del 2019, se propuso nuevamente su aprobación con una reevaluación de datos donde se mostraba que en dosis altas el anticuerpo reducía el déficit cognitivo en hasta un 22% con efectos secundarios como edema. Por lo que, seguida de la examinación de los datos clínicos presentados, en junio del 2021 la FDA anunció la aprobación de aducanumab para el tratamiento de la EA con el nombre comercial de Adulhem. No obstante, su aprobación acelerada ha sido controversial y es blanco de objeciones por parte del comité científico, además de haber sido restringido su uso por parte de la FDA solo en pacientes con déficit cognitivo leve (Tatulian, 2022).

Por otro lado, anticuerpos desarrollados contra especies modificadas post-traduccionalmente, como por ejemplo A β pE, se han postulado como unas de las opciones más prometedoras. Un claro ejemplo es del anticuerpo donanemab, un anticuerpo humanizado IgG1 cuyo epítipo es la región piroglutamada pE3-7. En pruebas de fase II donanemab demostró una amplia eliminación de placas de A β , así como una mejora cognitiva. Sin embargo, también mostró una mayor incidencia de ARIA-E (Alawode et al., 2021).

A pesar del gran número de fracasos obtenidos en desarrollar estrategias inmunoterapéuticas anti-A β , la reciente aprobación de aducanumab junto con los resultados prometedores de donanemab, apoyan al uso anticuerpos anti-A β como tratamiento de la EA. Por lo que es necesario continuar con el desarrollo de agentes terapéuticos basados en estrategias prometedoras como el uso de especies piroglutamadas como blancos terapéuticos.

Antecedentes.

Previamente en el laboratorio se produjeron dos anticuerpos monoclonales (AcMo) anti-A β pE11-42 con el fin de poder implementarlos como inmunoterapéuticos o agentes de diagnóstico para la EA. El primero de estos anticuerpos, 4G11, se produjo al inmunizar ratones BALB/c con el péptido sintético A β pE11-42. Por otro lado, el anticuerpo 4D5 se obtuvo al inmunizar ratones transgénicos con patología tipo Alzheimer 3xTg-AD con el péptido sintético A β pE11-42.

En una caracterización previa del anticuerpo 4D5 se describió que es capaz de unirse no solamente al péptido A β pE11-42, si no que, además puede reconocer a otras especies patológicas de A β , la especie completa A β 1-42 y A β pE3-42. Esta reactividad cruzada se debe a que se identificó, en un mapeo de epítomos utilizando diferentes fragmentos del péptido A β en un ELISA, que el epítopo que reconoce el anticuerpo monoclonal 4D5 se encuentra en la región central del péptido A β de longitud completa, la cual se encuentra presente en la mayoría de las especies patológicas del péptido A β .

Por último, la descripción previa del anticuerpo monoclonal 4G11 nos indica que reconoce específicamente a la especie A β pE11-42 y que es capaz de unirse a agregados nativos en muestras de cerebro de pacientes con EA.

Justificación.

La EA es una de las causas de demencia más común, y es una patología que cada vez se vuelve más presente en la población humana, principalmente debido a un aumento en la esperanza de vida y al crecimiento de la incidencia de comorbilidades que incrementan el riesgo de padecer la enfermedad. Los tratamientos actuales de la EA se basan en un régimen sintomático y no disminuyen la progresión de la enfermedad, por lo que es necesario continuar con la búsqueda de medicamentos que logren modificar el curso de la enfermedad. La inmunoterapia pasiva contra A β es una de las estrategias más exploradas en las últimas décadas y junto con la reciente aprobación de Adulhem, se ha postulado como una de las opciones más prometedoras para desarrollar una terapia efectiva para el tratamiento de la EA. Sin embargo, la limitada efectividad de Adulhem apoya a continuar con el desarrollo de alternativas con base en la inmunoterapia pasiva. Uno de los blancos que ha llamado la atención recientemente son las especies modificadas a partir de especies aminotruncadas de A β , las especies piroglutamadas. Estas especies han demostrado una mayor correlación con la severidad de la patología y un papel más importante en la patogenicidad de la EA, por lo que la investigación en agentes terapéuticos que ayuden a la eliminación de estas especies tóxicas nos acercaría al desarrollo de una terapia efectiva para el tratamiento de la EA. Un claro ejemplo son los resultados favorables obtenidos en pruebas clínicas del anticuerpo donanemab.

Con todo esto podemos decir que el desarrollo de anticuerpos monoclonales anti-A β pE11-42, contribuye a la investigación para generar terapias efectivas para el tratamiento o diagnóstico de la EA.

Objetivo General.

Caracterizar los anticuerpos monoclonales anti-A β pE11-42 4D5 y 4G11

Objetivos particulares.

- Realizar el mapeo de epítomos de los anticuerpos 4D5 y 4G11 utilizando bibliotecas de péptidos desplegados en fagos filamentosos.
- Realizar el mapeo de epítomos del anticuerpo 4G11 mediante ELISA
- Determinar el reconocimiento de diferentes formas de A β (desde monómeros hasta oligómeros) mediante Western Blot por el anticuerpo 4G11.

Metodología.

Péptidos y compuestos químicos.

Todos los compuestos químicos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los péptidos humanos sintéticos A β 1-42, A β 1-16, A β 12-28, A β 11-25 y A β 25-35, así como los péptidos piroglutamados A β pE11-42 y A β pE3-42 fueron obtenidos de AnaSpec (San Jose, CA, USA). Para todos los experimentos, cada uno los péptidos sintéticos fueron disueltos en agua desionizada (3 mg en 1 mL de H₂O) y la solución fue agitada para generar una suspensión uniforme. Después de tres ciclos de congelación y descongelación, la solución de péptidos se dejó agregar durante toda la noche a 4°C.

Mapeo de Epítomos de 4G11 mediante ELISA.

Para el mapeo de epítomos, se sensibilizó una placa de 96 pozos NuncTMMicroWell (Thermo Scientific) con 100 μ L de la correspondiente solución de los fragmentos de A β 1-42, A β 1-16, A β 11-25, A β 11-42 y A β 12-28 o especies piroglutamadas A β pE3-42 y A β pE11-42 a una concentración de 10 μ g/mL en amortiguador de carbonatos (0.1 M, pH 9.5) y se incubó a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, se realizaron 4 lavados con 300 μ L de PBS-Tween 0.2%, repitiéndolos entre cada paso. Se bloqueó la placa con 200 μ L de PBS/Tween 0.2%/Leche 2% durante 1 h a 37°C. Se agregaron 100 μ L del AcMo 4G11 en PBS/Tween 0.2%/Leche 2% diluido 1:500 y se incubó a 37°C por 1 h. Una vez terminada la incubación, se agregó el anticuerpo secundario, anti-IgG2b de ratón acoplado a HRP, diluido 1:2500 en PBS/Tween 0.2%/Leche 2% y se incubó durante 1 h a 37°C. Después, se agregaron 100 μ L/pozo de sustrato ABTS (Invitrogen, MD, USA), se incubó durante 30 min a 37°C y se midió la absorbancia a 405 nm. Como control positivo se realizó el ensayo

utilizando una mezcla de anticuerpos comerciales anti-A β Bam90.1 (epítopo 20-23) y Bam10 (epítopo 1-12) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), ambos a una dilución de 1:1000.

Western Blot para detectar las diferentes formas de A β sintético con AcMo 4G11.

Se realizó la electroforesis con 1 μ g de los péptidos sintéticos pre-agregados A β pE11-42, A β pE3-42 y A β 1-42 en un gel de gradiente de acrilamida NuPage 4-12% bis-tris (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a 200 V por 45 min. El gel fue transferido a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) y posteriormente se dejó incubando toda la noche a 4°C en agitación con 20 mL de la solución de bloqueo PBS/Tween 0.2%/Leche 2%. Posteriormente, se agregaron 5 mL de una solución del AcMo 4G11 diluido 1:1000 en agitación a 4°C durante toda la noche. Después, se agregó el anticuerpo secundario anti-IgG2b de ratón (Biolegend, San Diego, CA, USA) acoplado a HRP diluido a 1:5000 en PBS/Tween 0.2%/Leche 2% y se incubó en agitación durante 90 min a temperatura ambiente. Finalizando, se reveló mediante quimioluminiscencia con SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Sci, Rockford, IL, USA). Como control positivo se realizó el stripping de la membrana con Restore Western Blot (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) y se utilizó el anticuerpo comercial anti-A β 4G8 (epítopo 18-22) (Bio Legend, San Diego, CA, USA) en una dilución 1:10,000.

Mapeo de epítopos utilizando bibliotecas de péptidos desplegados en fagos filamentosos.

Bioselección (Biopanning).

Se realizó el biopanning utilizando bibliotecas de péptidos desplegados en fagos filamentosos y los anticuerpos 4D5 o 4G11. Se agregó el anticuerpo de captura anti-IgG2c de ratón (Invitrogen, Rockford, IL, USA) o anti-igG2b, respectivamente, en 4 pozos de una placa de 96 pozos Nunc™ MicroWell (100 µL del anticuerpo de captura en amortiguador de carbonatos (0.1 M, pH 9.5) y se incubó durante 1 h a 37°C. Finalizando, se lavó 4 veces con 300 µL PBS/Triton X-100 0.2% y se repitieron los lavados entre cada paso. Se bloqueó con PBS/Leche 2% por 1 h a 37°C y después se agregaron 100 µL de AcMo 4D5 o 4G11 a una concentración de 2 µg/mL en PBS/Leche 2%/Triton X-100 0.2% y se incubó nuevamente durante 1 h a 37°C. Posteriormente, se agregaron 100 µL a 2×10^{11} UFP/mL de la biblioteca de péptidos Ph.D-7 (New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA) y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron 7 lavados y se eluyeron los fagos agregando 100 µL de HCl-glicina pH 2.3 e incubando durante 5 min a temperatura ambiente seguido de 10 min a 37°C. Se colectó el eluido, de los 4 pozos, en un tubo (Eluido 1) y se neutralizó con 25 µL de Tris base 2 M. Hasta este punto corresponde una ronda de selección. Se repitieron los pasos completando tres rondas de selección previa amplificación del eluido obtenido.

Amplificación de Fagos.

En 380 µL del eluido obtenido de la selección, se realizó la amplificación, transfiriéndolos a un matraz con 50 mL de medio con bacterias TG1 en fase exponencial y se incubó durante 4.5 h a 37°C y a 250 rpm.

Para la purificación se centrifugó el amplificado a 4000 rpm por 20 min a 4°C. Los fagos en el sobrenadante se precipitaron con 5 mL de PEG 20%/NaCl 2 M durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se centrifugaron por 10 min a 10,000 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante. Los pellets se resuspendieron con 1 mL de TBS

estéril y se colectaron en un tubo de microfuga para posteriormente centrifugar a 13,600 rpm a 4°C por 10 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de microfuga, los fagos se precipitaron con 200 µL de PEG 20%/NaCl 2 M y se centrifugaron nuevamente a 13,600 rpm a 4°C por 10 min; se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 200 µL de TBS estéril (Amplificado 1). Esta solución fue ocupada en lugar de la biblioteca en la posterior ronda de selección.

Titulación de partículas virales.

Para realizar la titulación de las partículas virales se estimó su concentración y se realizaron las diluciones necesarias en caldo 2xYT, del eluido o del amplificado para contabilizar de entre 25 y 250 UFPs. Se fundió el Top Agar y se mantuvo a 45°C. Se inició la titulación agregando a 200 µL de bacterias TG1, en fase exponencial, la dilución correspondiente de fagos y se incubó por 20 min a 37°C. Posteriormente, se agregaron 15 µL de Xgal/IPTG, se transfirieron a un tubo con Top Agar, se agitaron y se vaciaron en una placa con medio LB Agar. Se dejó incubar toda la noche a 37°C y al día siguiente se realizó el conteo de las placas azules.

Aislamiento de clonas positivas.

A partir de las placas de titulación del eluido de la tercera ronda de bioselección, se colectaron 21 clonas individuales, las cuales se colocaron en 10 mL de caldo 2xYT y se incubaron en agitación a 250 rpm, durante 4.5 h a 37°C. Después, se centrifugaron a 4,000 rpm durante 20 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante en tubos con 2 mL de PEG 20%/NaCl 2 M y se precipitó durante toda la noche a 4°C. Se purificaron los fagos de la misma manera que se describió anteriormente, ocupando volúmenes de 1.5 mL del sobrenadante precipitado y 300 µL de PEG 20%/NaCl 2 M.

ELISA para la selección de clonas positivas.

Para elegir las clonas positivas, se sensibilizó una placa de 96 pozos con el anticuerpo de captura anti-igG2c o anti-igG2b en 100 μ L amortiguador de carbonatos (0.1 M, pH 9.5) durante 1 h a 37°C y se bloqueó con PBS/leche 2%/Tween 0.2% durante 1 h a 37°C. Posteriormente, se agregó 1×10^{11} UFPs de las clonas purificadas en PBS/leche 2% y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se agregó suero anti-M13 hecho en ratón y se incubó durante 1 h a 37°C. Por último, se agregó un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a HRP (Invitrogen, Rockford, IL, USA). Para revelar se agregó 100 μ L de ABTS y se midió a los 30 min de incubación a 37°C la absorbancia a 405 nm. Entre cada paso se realizaron 4 lavados con 300 μ L de PBS/Tween 0.2%.

Las clonas que alcanzaron más de 0.3 OD, fueron consideradas como positivas y se seleccionaron para ser secuenciadas.

Purificación de ADN viral de cadena sencilla.

Para purificar el ADN de los fagos primero se volvieron a precipitar agregando 300 μ L de PEG 20%/NaCl 2 M a 1.5 mL de sobrenadante, se incubó en hielo durante 1 h, se centrifugó a 13,600 rpm a 4°C durante 10 min y se eliminó el sobrenadante mediante aspiración al vacío. Posteriormente, se agregaron 200 μ L de amortiguador NaCl 4 M/Tris-HCl 10 mM/EDTA 1 mM pH 8 y 500 μ L de etanol absoluto por 10 min. Terminada la incubación se centrifugó durante 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se realizaron lavados con etanol 70%. Por último, se centrifugó otra vez, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 15 μ L de agua desionizada.

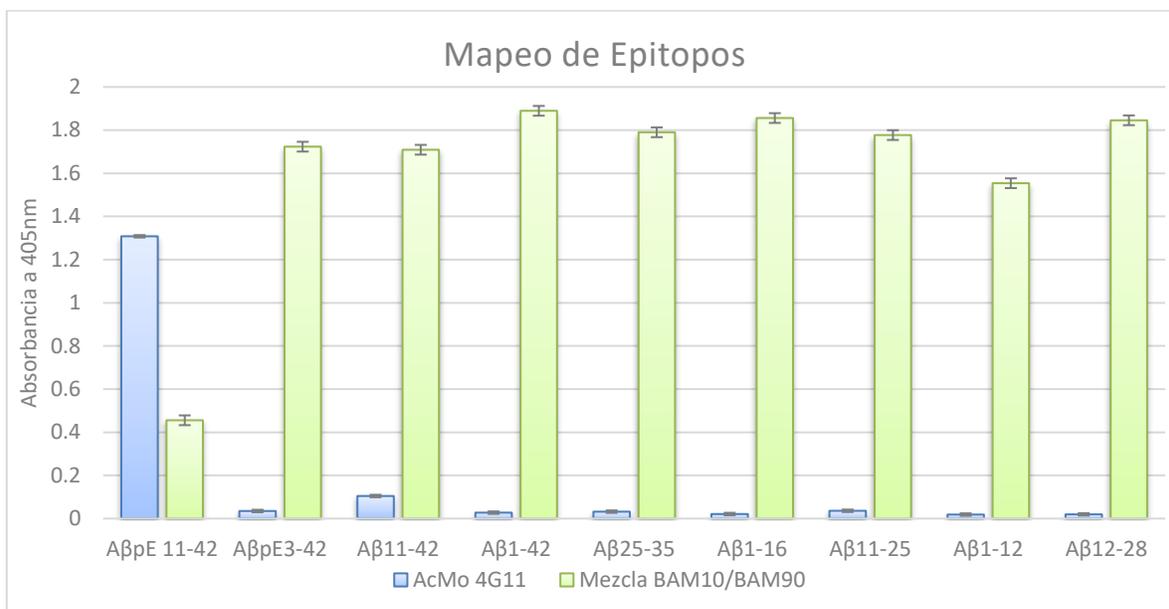
Secuenciación del material genético de los Fagos.

La secuenciación de ADN de cadena sencilla se realizó utilizando el primer -96 gIII incluido en el Kit Ph.D. de New England Biolabs, a una concentración de 100 pmol/ μ L. Las muestras se secuenciaron con Genetic Analyser 3500XL utilizando el kit Big Dye Terminator v3 (Applied Biosystems) en el Instituto de Biología de la UNAM.

Resultados.

El anticuerpo AcMo 4G11 no reconoce ningún fragmento de las regiones amino, central y carboxilo del péptido A β .

Para identificar el epítipo reconocido por el AcMo 4G11 se realizó un primer acercamiento mediante ELISA ocupando fragmentos del péptido A β (A β 1-12, A β 1-16, A β 11-42, A β 11-25, A β 12-28 y A β 25-35); así como, los péptidos piroglutamados A β pE11-42 y A β pE3-42. Los diferentes fragmentos corresponden a regiones amino, centrales y carboxilo del péptido A β . Como se puede observar en la gráfica 1, el anticuerpo 4G11 no reconoció a ningún fragmento del péptido A β , incluyendo a la especie aminotruncada A β 11-42. En cuanto a las especies piroglutamadas el AcMo 4G11 solo fue capaz de reconocer al péptido A β pE11-42. Por otro lado, la mezcla de anticuerpos comerciales anti-A β BAM10/BAM90.1 confirmó la presencia de estos péptidos en el ensayo.



Gráfica 1. Mapeo de epítomos del AcMo 4G11 por ELISA. El AcMo 4G11 reconoce exclusivamente al péptido pirroglutamado AβpE11-42. Mientras que la mezcla de anticuerpos reconoce todos los fragmentos y en menor medida a la especie pirroglutamada AβpE11-42.

Reconocimiento de diferentes formas de Aβ por el AcMo 4G11.

Una de las especies más tóxicas del péptido Aβ son los oligómeros solubles, así que es relevante determinar la capacidad de reconocimiento de dichas especies, por lo que se realizó un Western Blot ocupando los preparados pre-agregados de los tres péptidos sintéticos más importantes en la EA. En la figura 5 se muestra que el anticuerpo 4G11 reconoció exclusivamente a los agregados del péptido AβpE11-42. De manera más detallada, se observó que las especies reconocidas por el AcMo 4G11 son la especie monomérica, con un peso molecular aproximado de 3.5 KDa, la especie tetramérica y pentamérica, de entre 10 y 15 KDa; y por último se observó un barrido donde se encuentran los oligómeros de mayor peso molecular. Por otro lado, tras realizar el stripping de la membrana, el anticuerpo comercial anti-Aβ 4G8 mostró la presencia, de los agregados de las otras dos especies, Aβ1-42 y AβpE3-42, junto con los agregados que reconoció 4G11 de la especie AβpE11-42, previamente mencionados.

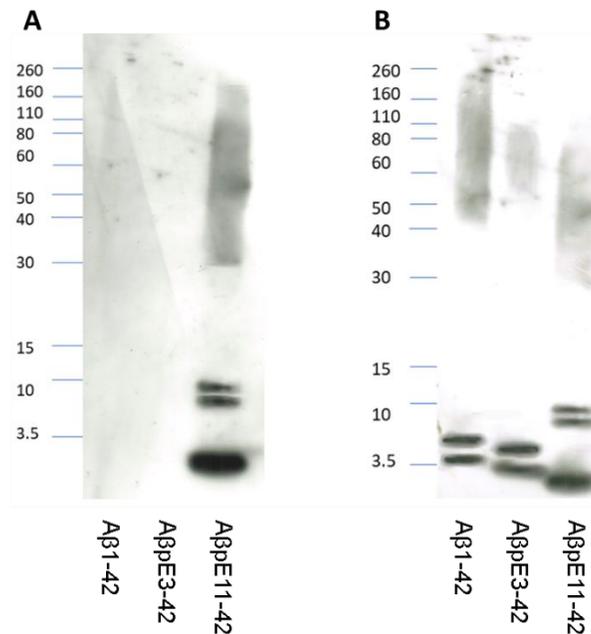
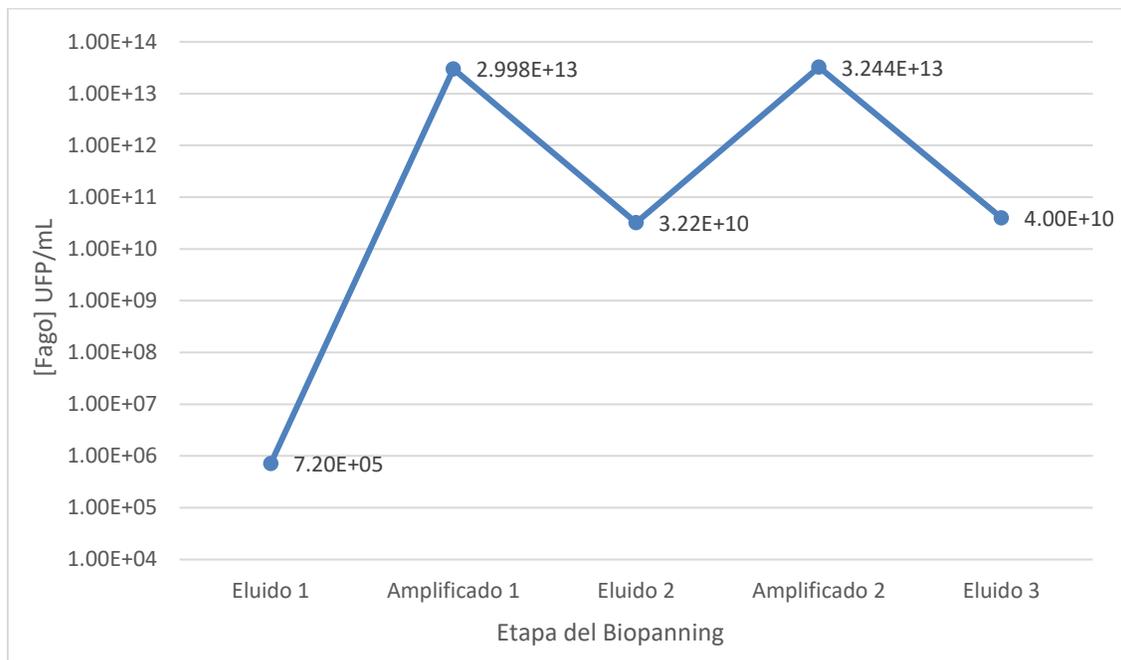


Figura 5. Western Blot de los péptidos patológicos de Aβ. (A) El AcMo 4G11 reconoce únicamente a las especies monoméricas y oligómeros de diferentes pesos moleculares del péptido AβpE11-42. (B) Una vez realizado el stripping, el anticuerpo comercial 4G8 muestra la presencia de los monómeros y oligómeros de los otros dos péptidos patológicos Aβ1-42 y AβpE3-42.

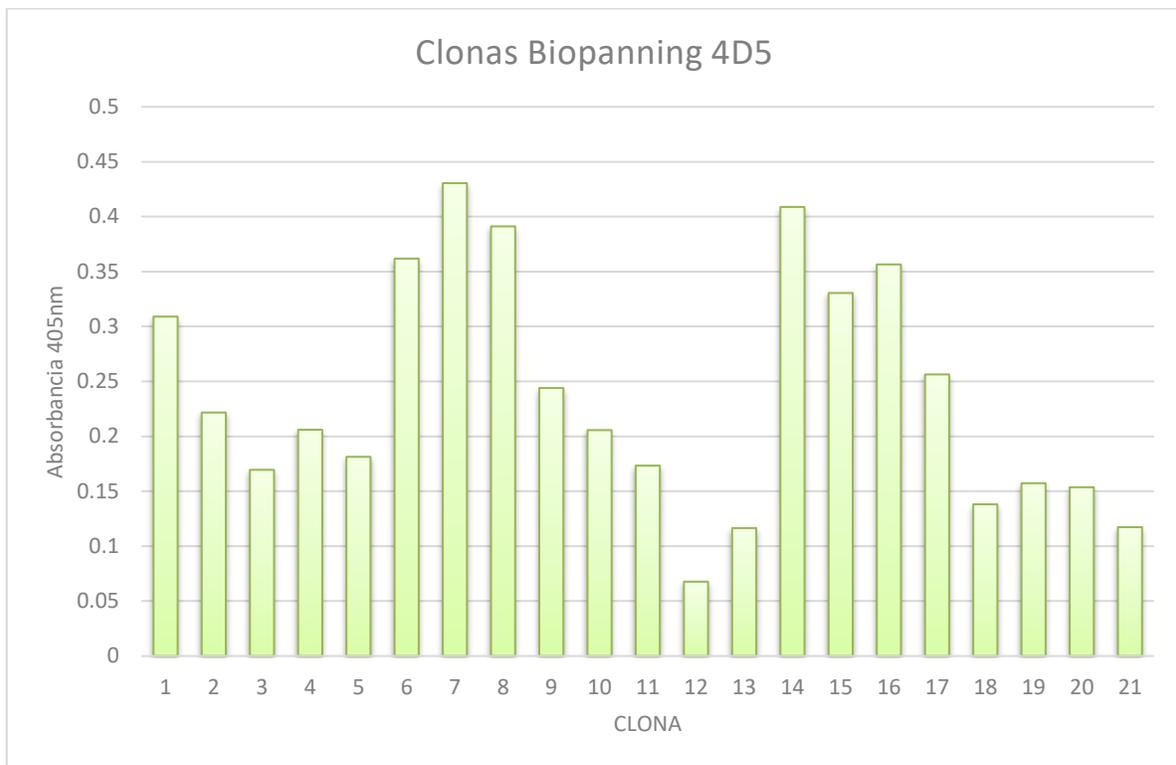
Mapeo de epítomos del AcMo 4D5 utilizando biblioteca de heptapéptidos desplegados en fago filamentoso M13.

Para poder identificar un mimótopo del epítomo que reconoce el AcMo 4D5 se realizaron 3 rondas de bioselección a partir de una biblioteca de heptapéptidos desplegados en fago filamentoso M13. A lo largo del experimento se determinó el título de fagos eluidos y de los amplificadas que se ocuparían para la siguiente ronda de bioselección. En la gráfica 2, se observa que en el transcurso de las tres rondas de bioselección, hubo un aumento y posterior estabilización en el título de fagos eluidos (7.2×10^5 , 3.22×10^{10} y 4×10^{10} UFP/mL, respectivamente), cuando la entrada de UFP a cada ronda fue constante por la amplificación. Este comportamiento indicó una saturación de la capacidad de captura de clonas.



Gráfica 2. Título de Fagos filamentosos M13 a lo largo de las rondas de bioselección.

A partir de la titulación del eluido de la tercera ronda de bioselección, se aislaron 21 clonas de fagos para posteriormente realizar el ELISA de selección. Solo aquellas clonas que mostraron mayor reactividad en el ensayo de ELISA fueron elegidas para ser secuenciadas. Para el caso del AcMo 4D5, se eligió como condición de selección, todas aquellas clonas con más de 0.3 OD. En la gráfica 3, se observa que las clonas 1, 6, 7, 8, 14, 15 y 16 fueron las que cumplieron con el criterio de positividad por lo que se escogieron para ser secuenciadas. Como control se eligió la clona negativa 12 para ser secuenciada y comparar los resultados con las clonas positivas.



Gráfica 3. ELISA de selección de clonas positivas para secuenciar del biopanning del AcMo 4D5. Como criterio de selección se estableció una señal mayor a 0.3 OD, por lo que las clonas 1, 6, 7, 8, 14, 15 y 16 fueron escogidas para secuenciar junto con la clona negativa 12.

En la Figura 6, se presentan los resultados de secuenciación, colocando la secuencia de aminoácidos de los péptidos desplegados en las diferentes clonas. Se observa que la mayoría de las clonas desplegaban el péptido GSFFYED y solo una clona desplegaba el péptido EYFFYED que tiene cierta homología con el anterior. Por otro lado, la clona negativa 12 tuvo una secuencia diferente, sin embargo, conservó el pequeño motivo FF común entre las secuencias de las clonas positivas.

Clona	Secuencia de Aminoácidos Ph.D-7						
1	G	S	F	F	Y	E	D
6	G	S	F	F	Y	E	D
7	G	S	F	F	Y	E	D
8	G	S	F	F	Y	E	D
14	G	S	F	F	Y	E	D
16	G	S	F	F	Y	E	D
15	E	Y	F	F	Y	E	D
12 (-)	E	T	F	F	D	E	P

Figura 6. Esquema de las secuencias de los heptapéptidos de las clonas secuenciadas. El motivo FFXED se encuentra presente en todas las secuencias de las clonas positivas. En cuanto a la clona negativa se observa una secuencia diferente.

En la figura 7 se realizó la comparación de la secuencia de aminoácidos que conforman la región central del péptido A β con los péptidos desplegados en las clonas positivas, resaltando el motivo FFXED común entre los péptidos analizados.

	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	%
Secuencia A β	E	V	H	H	Q	K	L	V	F	F	A	E	D	V	G	S	N	K	
Secuencia Ph.D-7							G	S	F	F	Y	E	D						86
							E	Y	F	F	Y	E	D						14

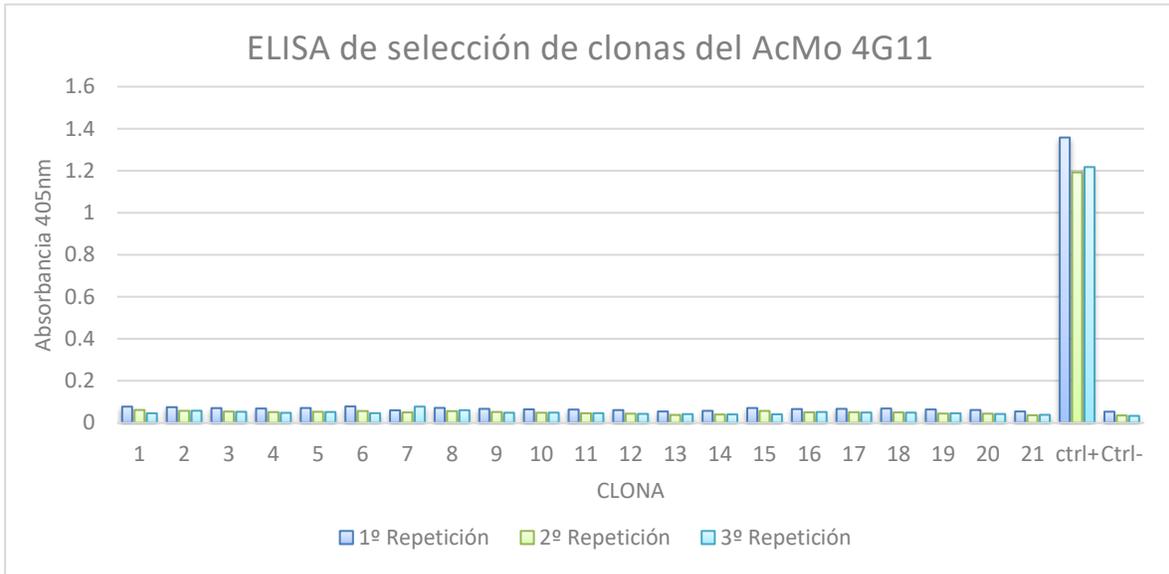
Figura 7. Comparación entre la secuencia del péptido A β y las secuencias de los heptapéptidos de las clonas positivas obtenidas del biopanning del AcMo 4D5.

Mapeo de epítomos del AcMo 4G11 utilizando biblioteca de heptapéptidos desplegados en fago filamentoso M13.

En la tabla 1 se observan los títulos de los fagos en cada etapa del biopanning realizado con el anticuerpo 4G11, mostrando la presencia de fagos en el eluido y en los amplificados a lo largo de las bioselecciones. Como se observa en la gráfica 4, no se obtuvieron clonas positivas en el ninguna de las tres repeticiones que se realizaron del mapeo de epítomos utilizando heptapéptidos desplegados en fagos filamentosos.

Tabla 1. Título de Fagos filamentosos M13 obtenidos a lo largo de las tres repeticiones del mapeo de epítomos del AcMo 4G11 mediante el uso de heptapéptidos desplegados en fagos filamentosos M13

Etapa	Título de Fagos obtenidos (UFP/mL)		
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
Eluido 1	1.05×10^4	1.4×10^5	2.2×10^4
Amplificado 1	7.76×10^{11}	7.04×10^7	5.84×10^{12}
Eluido 2	1.2×10^5	$6.22 \times 10^{5^\circ}$	6.9×10^5
Amplificado 2	1.56×10^{12}	9.78×10^{12}	1.55×10^{13}
Eluido 3	$1.66 \times 10^{5^\circ}$	$3.76 \times 10^{5^\circ}$	$1.5 \times 10^{7^\circ}$



Gráfica 4. ELISA de selección de clonas positivas obtenidas tras 3 rondas de bioselección. Se realizaron tres repeticiones del mapeo de epítomos del AcMo 4G11, de las cuales ninguna de las 21 clonas aisladas, de cada una de las repeticiones, cumplió con el criterio de positividad.

Discusión.

La EA es la causa más común de demencia ocupando hasta el 80% de los casos diagnosticados (Alzheimer's Association, 2020). Esta enfermedad ocurre como un complejo sinergismo entre procesos de envejecimiento, predisposición genética, estilo de vida y factores ambientales, que desencadenan procesos patológicos en el cerebro. Con el incremento en la expectativa de vida de las últimas décadas, la población de la tercera edad afectada por la EA se ve aumentada en la misma proporción. Si esta tendencia continua en los siguientes años, se observará un aumento de la carga en las instituciones de salud, debido a un incremento en el costo de tratamientos, hospitalizaciones y personal de cuidado a los pacientes afectados por la EA y demencias relacionadas. Por lo que es de vital importancia tener un tratamiento eficaz de la EA que impacte directamente en los procesos patológicos, y así lograr interferir con el progreso de la enfermedad.

Recientemente la FDA otorgó la aprobación acelerada para el uso de un anticuerpo monoclonal anti-A β , aducanumab (nombre comercial Adulhem), para el tratamiento de la EA exclusivamente en pacientes con déficit cognitivo leve, siendo este, el único medicamento para el tratamiento de la EA aprobado en décadas (Tatulian, 2022). Sin embargo, esta aprobación ha sido objeto de críticas y cuestionamientos por parte del comité científico y la Unión Europea ha rechazado tal aprobación (Behl et al., 2022). Es importante mencionar que la afinidad de unión de aducanumab con las especies aminotruncadas/piroglutamadas de A β es 31-400 veces menor en comparación con el péptido de longitud completa (Arndt et al., 2018), por lo que es necesario continuar con la investigación en la inmunoterapia anti-A β .

Últimamente las especies aminotruncadas/piroglutamadas de A β han llamado la atención como posibles blancos terapéuticos o de diagnóstico debido a que su presencia en el cerebro se ha relacionado estrechamente con la EA, así como en la patogenicidad de esta. Por lo que se ha comenzado a desarrollar anticuerpos contra estas especies neurotóxicas del péptido A β . Un claro ejemplo es el anticuerpo

donanemab (anti-A β pE3-42), el cual se encuentra actualmente en pruebas clínicas de fase III (ClinicalTrials.gov ID: NCT04437511).

Previamente se generaron dos anticuerpos monoclonales anti-A β pE11-42 (4D5 y 4G11) los cuales pueden aportar información para el desarrollo de agentes terapéuticos o de diagnóstico para la EA. Dichos anticuerpos fueron generados en ratones; sin embargo, el AcMo 4D5 se generó al inmunizar ratones transgénicos 3XTg-AD, un modelo murino con patología tipo Alzheimer, mientras que el AcMo 4G11 se generó en ratones BALB/c sanos, la cepa que se usa comúnmente para la producción de anticuerpos monoclonales. Probablemente por esa razón, a pesar de que en ambos casos se ocupó el mismo inmunógeno (péptido A β pE11-42), se obtuvieron anticuerpos con diferentes características.

En una previa caracterización, el AcMo 4D5 mostró una reactividad cruzada con los péptidos patológicos A β 1-42 y A β p3-42. Esto nos indicaba que los tres péptidos comparten el epítipo reconocido por el anticuerpo. Los resultados de ELISA utilizando los fragmentos del péptido A β comprobaron la hipótesis: el AcMo 4D5 solo reconoce aquellos fragmentos de la región central del péptido A β , la cual se encuentra presente en los tres péptidos patológicos de la EA. Para definir aún más el epítipo reconocido por el AcMo 4D5 realizamos el mapeo de epítipos con heptapéptidos desplegados en fagos del AcMo 4D5 (Figura 6). Los resultados obtenidos coincidieron con los resultados de mapeo mediante ELISA. Identificamos el motivo FFYED en común entre la secuencia de heptapéptidos de las clonas positivas. Al comparar los mimótopos con la secuencia del péptido A β 1-42 (Figura 7) se observa una homología del motivo FFYED con los aminoácidos 19-23 de la región central, lo cual indica que el epítipo del anticuerpo 4D5 está comprendido por los aminoácidos 19-23 del péptido A β . A pesar de que el motivo FFYED comparte homología con A β , tiene como diferencia la tirosina (Y) central contra la alanina (A) 21 de la secuencia del péptido A β . Sin embargo, a pesar de ser dos aminoácidos estructuralmente distintos ambos tienen una cadena lateral neutra, es decir, que no hay una carga neta en el residuo de estos aminoácidos.

Un anticuerpo con reconocimiento de los tres principales péptidos amiloides relacionados con la patología de la EA, como es el AcMo 4D5, puede ser de importancia para el desarrollo de futuros tratamientos debido a que con un solo producto se puede conseguir la disminución de agregados amiloides compuestos por las tres especies patológicas.

Por otro lado, al realizar el mapeo de epítomos mediante ELISA empleando el AcMo 4G11 (Gráfica 1), este no reconoció ningún fragmento del péptido A β , incluyendo la especie no piroglutamada del péptido A β pE11-42. Estos resultados sugieren que el epítomo de AcMo 4G11 es conformacional y que el piroglutamato es necesario para el reconocimiento por parte del AcMo 4G11. De manera inesperada, tras realizar tres veces el mapeo de epítomos con heptapéptidos desplegados en fagos filamentosos del AcMo 4G11, no se obtuvo ninguna clona positiva (Gráfica 4). Debido a que a lo largo del experimento se realizó la titulación de fagos provenientes de la biblioteca sin ningún contratiempo (Tabla 1), podemos proponer la siguiente hipótesis: el epítomo del AcMo 4G11 es de tipo conformacional y suficientemente complejo, que no puede ser replicado con heptapéptidos, por lo que sería necesario ocupar una biblioteca con dodecapéptidos desplegados en fagos filamentosos que permitan identificar un mimótopo. Otra explicación sería la importancia del piroglutamato en el reconocimiento del AcMo 4G11, ya que, al ser un aminoácido modificado, este no está presente en la biblioteca de heptapéptidos utilizada. A pesar de esto, el AcMo 4G11 es de gran interés debido a que se une de manera específica al péptido A β pE11-42 y puede ser utilizado en protocolos de diagnóstico.

Por último, el péptido A β es propenso a agregarse y formar oligómeros, a los cuales se les ha atribuido ser las formas más neurotóxicas, por lo que es importante determinar si un agente inmunoterapéutico es capaz de reconocer las diferentes formas agregadas de A β y así permitir su eliminación. Nuestros resultados indican que el AcMo 4G11, además de reconocer la especie monomérica del péptido A β pE11-42, puede reconocer sus oligómeros de bajo peso molecular (tetrámeros y pentámeros), así como los de mayor peso molecular (Figura 5). Por otro lado, el anticuerpo 4D5 es capaz de reconocer la especie monomérica y oligómeros de los

péptidos A β 1-42, A β pE11-42 y A β pE3-42. Esto brinda la ventaja que, al ser ocupado como agente terapéutico, el anticuerpo 4D5 permitirá eliminar aquellos oligómeros formados por la especie completa de A β o de los péptidos piroglutamados A β pE, como ya se mencionó anteriormente.

En conclusión, a pesar del escepticismo que existe en los últimos años debido a la falta de resultados positivos en ensayos clínicos, la inmunoterapia de la EA sigue siendo un campo de investigación con avances rápidos e importantes. Por ello, el desarrollo de nuevos protocolos de inmunización activa con inmunógenos basados en los péptidos amiloides o protocolos de administración de AcMo es muy importante para alcanzar el objetivo de tener un tratamiento eficaz contra la EA. Los dos anticuerpos caracterizados en este estudio pueden ser de interés para futuros desarrollos.

Conclusiones.

- La reactividad cruzada con los péptidos patológicos A β 1-42 y A β pE3-42 del AcMo 4D5 es debida a que los tres péptidos comparten el epítipo reconocido por el anticuerpo, convirtiéndolo en un anticuerpo con potencial uso para el tratamiento de la EA.
- Los resultados de mapeo de epítipos por dos métodos diferentes demuestran que el AcMo 4D5 se une a la región central de los tres péptidos A β 1-42, A β pE3-42 y A β pE11-42 reconociendo la secuencia de aminoácidos FFY(A)ED.
- El AcMo 4G11 reconoce de manera específica al péptido A β debido a que, en el mapeo de epítipos, este reconoce un epítipo conformacional presente únicamente en A β pE11-42 y que no es posible reproducirlo con heptapéptidos.
- La capacidad de reconocer especies oligoméricas de A β de ambos anticuerpos monoclonales, 4D5 y 4G11, los hace de interés para el desarrollo de futuros protocolos de diagnóstico y tratamiento.

Perspectivas.

- Con el objetivo de describir detalladamente el epítipo del AcMo 4G11 se propone realizar el mapeo de epítipos ocupando dodecapéptidos desplegados en fagos filamentosos.
- De acuerdo con los resultados obtenidos, los anticuerpos monoclonales 4D5 y 4G11 son candidatos aptos para ser parte de ensayos preclínicos en ratones transgénicos con patología tipo Alzheimer para evaluar su eficacia en la disminución de fenómenos patológicos característicos de la EA como la eliminación de agregados de A β o una mejora cognitiva.
- En caso de obtener resultados favorables en los estudios preclínicos ambos anticuerpos pueden ser humanizados mediante ingeniería genética y así poder ser sometidos a pruebas clínicas para ser evaluados como posibles agentes terapéuticos para la EA.

Referencias.

- Alawode, D. O. T., Heslegrave, A. J., Fox, N. C., & Zetterberg, H. (2021). Donanemab removes Alzheimer's plaques: what is special about its target? *The Lancet Healthy Longevity*, 2(7), e395–e396. [https://doi.org/10.1016/S2666-7568\(21\)00144-6](https://doi.org/10.1016/S2666-7568(21)00144-6)
- Alzheimer's Association. (2019). 2019 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 15(3), 321–387. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.01.010>
- Alzheimer's Association. (2020). 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 16(3), 391–460. <https://doi.org/10.1002/alz.12068>
- Arndt, J. W., Qian, F., Smith, B. A., Quan, C., Kilambi, K. P., Bush, M. W., ... Weinreb, P. H. (2018). Structural and kinetic basis for the selectivity of aducanumab for aggregated forms of amyloid- β . *Scientific Reports 2018 8:1*, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24501-0>
- Atri, A. (2019). The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum. *Medical Clinics of North America*, 103(2), 263–293. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.10.009>
- Barage, S. H., & Sonawane, K. D. (2015). Neuropeptides Amyloid cascade hypothesis : Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer ' s disease. *YNPEP*, 52, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.06.008>
- Behl, T., Kaur, I., Sehgal, A., Singh, S., Sharma, N., Makeen, H. A., ... Bungau, S. (2022). "Aducanumab" making a comeback in Alzheimer's disease: An old wine in a new bottle. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 148, 112746. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2022.112746>
- Bergström, P., Agholme, L., Nazir, F. H., Satir, T. M., Toombs, J., Wellington, H., ... Zetterberg, H. (2016). Amyloid precursor protein expression and processing are differentially regulated during cortical neuron differentiation. *Scientific Reports*, 6(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep29200>
- Calderon, A. L., & Duyckaerts, C. (2018). Alzheimer disease. In *Neuropathology* (Vol. 145, pp. 325–337). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00023-7>
- Crous-Bou, M., Minguillón, C., Gramunt, N., & Molinuevo, J. L. (2017). Alzheimer's disease prevention: From risk factors to early intervention. *Alzheimer's Research and Therapy*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13195-017-0297-z>
- DeTure, M. A., & Dickson, D. W. (2019). The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 14(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0333-5>
- Dunys, J., Valverde, A., & Checler, F. (2018). Are N- and C-terminally truncated A β species key pathological triggers in Alzheimer ' s disease ?, 293, 15419–15428. <https://doi.org/10.1074/jbc.R118.003999>
- Farooqui, A. A. (2017a). Immunotherapy for the Treatment of Alzheimer's Disease. In *Neurochemical Aspects of Alzheimer's Disease* (pp. 331–359). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809937-7.00009-4>
- Farooqui, A. A. (2017b). Neurochemical Aspects of β -Amyloid Cascade Hypothesis for Alzheimer's Disease. In *Neurochemical Aspects of Alzheimer's Disease* (pp.

- 1–46). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809937-7.00001-X>
- Farooqui, A. A. (2017c). Risk Factors for Alzheimer's Disease. In *Neurochemical Aspects of Alzheimer's Disease* (pp. 47–91). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809937-7.00002-1>
- Gunn, A. P., Masters, C. L., & Cherny, R. A. (2010). Pyroglutamate-A β : Role in the natural history of Alzheimer's disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 42(12), 1915–1918. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.08.015>
- Kim, D. H., Yeo, S. H., Park, J.-M., Choi, J. Y., Lee, T.-H., Park, S. Y., ... Cha, H.-J. (2014). Genetic markers for diagnosis and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Gene*, 545(2), 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.05.031>
- Lewis, P. A., & Spillane, J. E. (2019). Alzheimer's Disease and Dementia. In *The Molecular and Clinical Pathology of Neurodegenerative Disease* (pp. 25–82). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811069-0.00002-1>
- Mantile, F., & Prisco, A. (2020, December 1). Vaccination against β -amyloid as a strategy for the prevention of alzheimer's disease. *Biology*. Biology (Basel). <https://doi.org/10.3390/biology9120425>
- Patwardhan, A. G., & Belemkar, S. (2021). An update on Alzheimer's disease: Immunotherapeutic agents, stem cell therapy and gene editing. *Life Sciences*, 282. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2021.119790>
- Perez-Garmendia, R., & Gevorkian, G. (2013). Pyroglutamate-Modified Amyloid Beta Peptides: Emerging Targets for Alzheimer's Disease Immunotherapy. *Current Neuropharmacology*, 11(5), 491–498. <https://doi.org/10.2174/1570159x11311050004>
- Plotkin, S. S., & Cashman, N. R. (2020). Passive immunotherapies targeting A β and tau in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105010>
- Reitz, C., & Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical Pharmacology*, 88(4), 640–651. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.024>
- Serrano, A., Frosch, M. P., Masliah, E., & Hyman, B. T. (2011). Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), a006189–a006189. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006189>
- Sullivan, C. P., Berg, E. A., Elliott-Bryant, R., Fishman, J. B., McKee, A. C., Morin, P. J., ... Fine, R. E. (2011). Pyroglutamate-A β 3 and 11 colocalize in amyloid plaques in Alzheimer's disease cerebral cortex with pyroglutamate-A β 11 forming the central core. *Neuroscience Letters*, 505(2), 109–112. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.09.071>
- Tatulian, S. A. (2022). Challenges and hopes for Alzheimer's disease. *Drug Discovery Today*. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.01.016>
- Tellechea, P., Pujol, N., Esteve-Belloch, P., Echeveste, B., García-Eulate, M. R., Arbizu, J., & Riverol, M. (2018). Early- and late-onset Alzheimer disease: Are they the same entity? *Neurología (English Edition)*, 33(4), 244–253. <https://doi.org/10.1016/J.NRLENG.2015.08.009>
- Vander Zanden, C. M., & Chi, E. Y. (2020, January 1). Passive Immunotherapies Targeting Amyloid Beta and Tau Oligomers in Alzheimer's Disease. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Elsevier B.V.

<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.10.024>

Waldemar, G., & Burns, A. (2017). *Alzheimer's Disease (Oxford Neurology Library)*. (G. Waldemar & A. Burns, Eds.) (Vol. 1). Oxford University Press.
<https://doi.org/10.1093/med/9780198779803.001.0001>