

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Identificación de Biomoléculas Inhibidoras de
agregados de Péptido Beta - Amiloide

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A

José Angel Montero Santamaría



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. GOHAR BEVORGYAN MARKOSIAN

MEXICO, D. F.



2004

COORDINACIÓN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

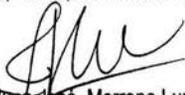
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 8 de noviembre del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **Montero Santamaría José Ángel**, con número de cuenta **92290309** con la tesis titulada: **"Identificación de Biomoléculas Inhibidoras de agregados de Péptido Beta-Amiloide"**, bajo la dirección del(a) **Dra. Gohar Gevorgyan Markosian**.

Presidente:	Dr. Abraham Landa Piedra
Vocal:	Dra. María de Lourdes Massieu Trigo
Secretario:	Dra. Gohar Gevorgyan Markosian
Suplente:	Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés
Suplente:	Dr. Karen Manucharyan

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 23 de noviembre del 2004


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

El presente trabajo se realizó en el Departamento Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Bajo la dirección de la Dra. Gohar Gevorgyan Markosian.

A mis padres Teresa y José Angel.

A mi hermana Nancy.

Agradecimientos

A la M. en C. María Elena Munguia y al Biol. Exp. Gonzalo Acero Galindo por su excelente asesoría técnica en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Gohar Gevorgyan por su inagotable paciencia y consideración.

A la Dra. Lourdes Massieu por su dirección y apoyo.

Al Dr. Karen Manucharyan por su guía profesional.

A Alberto y Erik por tantas batallas juntos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la Beca-crédito otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

INDICE

RESUMEN	1
ANTECEDENTES	3
OBJETIVOS	23
MATERIAL Y METODOS	24
RESULTADOS	34
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	46
PERSPECTIVAS	46
APÉNDICE 1	47
REFERENCIAS	54

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurológica progresiva que afecta a millones de personas en todo el mundo, siendo uno de los tipos de demencia más frecuentes después de los sesenta años. Durante su patogénesis, la acumulación de péptido beta-amiloide (β A) en el cerebro y su agregación en placas es un evento muy importante, por lo que se han realizado diversos estudios para encontrar compuestos que disuelvan o inactiven a las placas del péptido o que prevengan su agregación.

En el presente estudio se construyó la primera biblioteca de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) de anticuerpos anti- β A expresada en el bacteriófago filamentoso M13. Para la construcción de la biblioteca se utilizaron células de bazo de ratones inmunizados con péptido β A humano.

La biblioteca se seleccionó contra el péptido β A humano en tres rondas. Las clonas positivas obtenidas fueron secuenciadas y se analizaron los genes V_H y V_K mediante las herramientas computacionales ExPASy, BLAST e IMGT. Se seleccionaron dos clonas (AM2.9 y AM3.26) con regiones determinantes de complementaridad V_H y V_K idénticas excepto la HCDR2 y con genes de las líneas germinales idénticos. Las secuencias de DNA y aminoácidos de los anticuerpos scFv encontrados fueron registradas en el GenBank. Estos resultados indican que ocurrió una respuesta inmune oligoclonal en los ratones inmunizados con péptido β A humano.

Los anticuerpos anti β A humano de scFv seleccionados a partir de la biblioteca inmune podrían ser de interés para futuros estudios en la búsqueda de compuestos capaces de prevenir la formación de agregados de péptido β A y disolver las fibrillas, proto-fibrillas u oligómeros existentes, sin una respuesta inmune celular, por esto se sugiere la continuación de los experimentos de bioselección de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) de anticuerpos específicos contra el péptido β A humano como una herramienta poderosa en el desarrollo de moléculas terapéuticas para la enfermedad de Alzheimer.

ANTECEDENTES

La enfermedad de Alzheimer (EA) afecta a más de 12 millones de personas alrededor del mundo y es uno de los tipos de demencia más frecuentes después de los 60 años de edad (6). Los problemas individuales y el enorme costo para la sociedad ha incrementado la preocupación pública por esta enfermedad (13).

La EA es una enfermedad neurológica progresiva que tiene como consecuencia la pérdida irreversible de neuronas, particularmente en la corteza, el hipocampo, el sistema límbico y los ganglios basales. Sus características clínicas son la pérdida progresiva de la memoria, de juicio, de toma de decisiones, de orientación espacial y de lenguaje. Sus características patológicas son la pérdida neuronal, la presencia de placas seniles extracelulares de péptido β -Amiloide (β A), también llamadas placas neuríticas, conglomerados neurofibrilares y anormalidades neuroquímicas (1, 2, 7). Se denomina β A a aquellas proteínas con estructura secundaria de láminas- β que se tiñen con rojo Congo o con tioflavina-S (14).

Las placas neuríticas son lesiones multicelulares esféricas que contienen depósitos extracelulares de péptido β A en su mayor parte en forma fibrilar. Están rodeadas de axones degenerados y dendritas, células de microglía activadas y astrocitos reactivos (15). La densidad amiloide del centro de cada placa se ha relacionado con el estadio de formación de la placa, desde las placas recién formadas con un centro muy difuso, hasta las placas terminales con un centro denso (16).

El péptido β A de las placas neuríticas es un producto del metabolismo normal de una glicoproteína transmembranal llamada proteína precursora amiloide (APP). Existen dos vías principales para el procesamiento de la APP: por actividad alfa-secretasa se libera el ectodominio sAPP α N-terminal y se produce un

fragmento C-terminal de 83 residuos de aminoácidos (C83) que es transmembranal. Posteriormente la actividad gama-secretasa produce el fragmento p3 que es una forma N-terminal truncada del péptido β A. Por otro lado la actividad beta-secretasa libera el ectodominio sAPP β N-terminal produciendo un fragmento C-terminal transmembranal de 99 residuos de aminoácidos (C99). La actividad gama-secretasa, que corta a C99 y a C83 en la región transmembranal, produce el péptido β A de diferentes tamaños: de 39 a 43 aminoácidos (4,10).

Recientemente se ha postulado que el procesamiento anormal de la APP debido a mutaciones en su secuencia, conducen a la EA en algunas familias (3,4,8). Los datos obtenidos del estudio de mutaciones en familias poco frecuentes con desarrollo temprano de la EA se han utilizado para identificar blancos terapéuticos y para crear modelos animales (1).

A la fecha hay fuertes evidencias que indican que la variabilidad genética en el catabolismo del péptido β A y su remoción pueden contribuir al riesgo de desarrollo temprano de la EA (8,10). Sin embargo, cada vez mas reportes sugieren que la acumulación masiva del péptido β A de 42 aminoácidos (β A42) en fibrillas, es un evento primario en la patogénesis de la EA (1,3,4,6,7,8,12,13,14).

Desde el punto de vista genético la EA es dicotómica, puede ser de desarrollo temprano cuando hay mutaciones persistentes que se transmiten de manera autosomal, o puede ser de desarrollo tardío debido a polimorfismos comunes (9).

Se ha postulado que las placas neuríticas presentan neurotoxicidad que conduce a la muerte celular y en algunos estudios se ha correlacionado la densidad de las placas, y no el número de ellas, con las características clínicas de la EA (2,8), sin embargo no se ha encontrado correlación. Se propone que el incremento de especies de oxígeno reactivo y algunos metales como el hierro o el aluminio contribuyen a la degeneración neuronal (7). Adicionalmente se han identificado

algunos derivados de nitrógeno, enzimas proteolíticas y citosinas inflamatorias en los procesos de neurodegeneración en la EA (13,16). Se ha propuesto que la ingesta diaria de antioxidantes como las vitaminas C y E, puede reducir el riesgo de desarrollar la EA en individuos sin el alelo apo $\epsilon 4$ (7). Hoy día se postula que la apoptosis podría estar involucrada en la EA (11).

Debido a que el péptido βA está asociado a la EA, las proteasas que lo generan son de gran interés para el desarrollo de compuestos con potencial terapéutico (8). La beta-secretasa ha sido clonada y se han desarrollado inhibidores para ella (2,4,6,7), así mismo, recientemente se ha logrado identificar la gama-secretasa, y se han desarrollado tanto inhibidores como moduladores de su actividad (4,6). Sin embargo estos inhibidores secundarios pueden tener efectos con la función normal de las proteasas mencionadas.

Por eso son de interés otros compuestos que puedan desagregar los depósitos amiloides y/o prevenir la formación de oligómeros y fibrillas de péptido βA (10). Además de la secreción de péptido βA , se piensa que algunos cambios en la composición de la matriz extracelular pueden contribuir al desarrollo de la EA (12,13).

Después de que la APP alcanza la superficie celular, puede ser reinternalizada y transportada a los endosomas, en estos organelos ocurre el corte por la beta-secretasa, y el corte por la gama-secretasa ocurre en su camino de regreso hacia la superficie celular donde se libera, sin embargo, también puede acumularse intracelularmente (13).

Las fibrillas amiloides presentan un motivo estructural β -cruzado, contienen láminas- β paralelas que son perpendiculares al eje de la fibra con puentes de hidrógeno intra-fibrilares paralelos al eje de la fibra (5).

Se ha encontrado que las fibrillas de péptido β A no son las únicas formas neurotóxicas, sino que este también se ensambla en formas solubles: las protofibrillas que forman estructuras curvilíneas de 4-11 nm en diámetro y menos de 200 nm de longitud, *in vitro*, causan estrés oxidativo que desacopla los transportadores iónicos y de glucosa en la membrana celular, y la desestabilización de la homeostasis celular del calcio. Las protofibrillas también causan cambios electrofisiológicos lo que eventualmente conduce a la muerte neuronal. Oligómeros pequeños llamados ligandos difusibles derivados de β A (ADDL) también son neurotóxicos *in vitro*. Ambas formas escapan a la detección con anticuerpos dirigidos a las fibrillas del péptido β A (14).

El depósito de formas insolubles del péptido β A en estructuras similares a placas da como resultado daño estructural en los axones. Las neuronas responden con cambios locales en el sitio del daño con mecanismos de adaptación o regeneración pero en la EA estos resultan insuficientes debido al fuerte estrés mecánico generado por las placas de péptido β A mas compactas (16).

Es claro que el depósito de péptido β A en el cerebro es un evento relacionado con la edad y existe evidencia que indica que la formación de placas en cierto grado, es inevitable con la edad (15).

Estudios de inmunohistoquímica han mostrado una heterogeneidad neuroquímica en las placas neuríticas relativa a la forma del péptido β A involucrado, ya sea 40, 42 aminoácidos o de alguna otra isoforma del péptido. Esto sugiere que la forma del péptido β A ocasiona variaciones en su forma de depositarse y en la maduración de las placas de formas difusas a compactas (16).

Los oligómeros de péptido β A soluble representan micelas de proteínas, porque el péptido β A es anfipático y reactivo en su superficie, la formación de oligómeros es dependiente de una concentración crítica y su formación se correlaciona con la aparición de un ambiente hidrofóbico. Se ha observado que los

oligómeros solubles son neurotóxicos y se han encontrado en el cerebro de pacientes con la EA. Se ha sugerido que estos oligómeros no se acumulan con el tiempo pero pueden servir como núcleos para desarrollar e estructuras fibrilares (17).

Las mutaciones en los aminoácidos 22 y 23 del péptido β A le confieren propiedades de agregación y neurotoxicidad más altas que el péptido silvestre (wild-type) y presentan estructuras de lámina- β que se correlaciona con estas propiedades (18).

A la fecha no existe un diagnóstico definitivo para la EA excepto por la observación postmortem de placas neuríticas y conglomerados neurofibrilares en el cerebro y por eliminación de rasgos clínicos característicos de otras enfermedades neurodegenerativas. Por esta razón se han desarrollado técnicas para estudiar la localización de los depósitos de péptido β A *in vivo* y se han encontrado buenos resultados cuando se utiliza el péptido β A1-40 marcado radioactivamente conjugado con putrescina para aumentar su permeabilidad a la barrera hematoencefálica (BBB) (19).

Pero también se han desarrollado otras moléculas como la BSB que es capaz de detectar placas neuríticas en modelos murinos y es permeable a la BBB. Esta molécula esta diseñada para visualizar por imagen radiológica de las placas neuríticas en el cerebro de pacientes, y monitorear la progresión temporal de la EA y la remoción de las placas en respuesta a la terapia anti-amiloide (20).

La terminología de placa amiloide describe los agregados observados *in vivo*, mientras que protofilamento se refiere a las subunidades básicas, que también tienen una morfología fibrilar. Los protofilamentos son distintos de las protofibrillas que es un término que ha sido utilizado para describir el precursor cinético de las fibrillas amiloides. Mediante microscopía electrónica y otros estudios se llega a la conclusión de que las fibrillas amiloides están compuestas de

cinco o seis subunidades de protofilamentos que se enredan uno con otro a lo largo del eje longitudinal. Los datos obtenidos por difracción de rayos-X muestran que el centro de un protofilamento comprende láminas- β enrolladas que corren paralelas al eje de la fibra. Las láminas- β que constituyen la fibra corren perpendiculares al eje longitudinal y forman el protofilamento. Estas subunidades individuales se ensamblan por agregación lateral para producir las fibrillas amiloides. Las fibrillas amiloides tienen un canal central alrededor del que se organizan los protofilamentos, el canal puede contener agua o moléculas solventes organizadas (21).

En un paciente típico con EA hay una población mixta de oligómeros de péptido β A y placas neuríticas maduras, estos oligómeros pueden permanecer como moléculas solubles e interactuar destructivamente con las neuronas. Se han hecho estudios estructurales para identificar los mecanismos por los que estos oligómeros son importantes en la patogénesis de la EA con miras a desarrollar estrategias inhibitoras (22).

Se ha observado que las suspensiones de péptido β A42 son igualmente tóxicas a las del péptido β A40. Sin embargo el péptido β A42 presenta una cinética de agregación extremadamente rápida respecto del péptido β A40 (23).

Mediante el análisis de líquido cefalorraquídeo humano se ha encontrado que la agregación del péptido β A en la EA involucra rutas que normalmente producen el péptido extracelularmente y donde la cantidad de péptido acumulado depende de la proporción de péptido producido, la cantidad que se remueve y la velocidad a la que las formas solubles del péptido β A forman las fibrillas (24).

La principal diferencia entre las especies β A40 y β A42 son sus diferentes tasas de formación de fibrillas pero al parecer ambas especies contribuyen a la patogénesis de la EA, sin embargo el péptido β A40 requiere además otros factores como la presencia de APOE4 o la nucleación por β A42. Existe evidencia que apoya

que no es el depósito de péptido β A lo que desencadena la EA, sino más bien la agregación del péptido. Aunado a esto se han encontrado factores especie-específicos, y relacionados a la edad que modulan la toxicidad del péptido β A. Como ya se ha discutido pequeños cambios en la secuencia del péptido β A pueden desencadenar la EA, por lo que es imprescindible desarrollar métodos de detección y cuantificación efectivos para los distintos péptidos β A. Se ha encontrado que los niveles de péptido β A podrían estar elevados en pacientes antes y durante el desarrollo de la EA y que los niveles en plasma podrían ser útiles para predecir riesgo de desarrollar la EA, sin embargo conforme la enfermedad progresa los niveles de péptido β A decaen a valores normales, esto puede ser debido a que el péptido podría quedar secuestrado en las placas neuríticas o podría formar agregados que no son detectados por los métodos actuales (25).

Estudios en modelos transgénicos de la EA y en muestras de pacientes han demostrado que los depósitos de péptido β A más grandes y densos están asociados a pérdida neuronal y que no existe una penumbra de toxicidad sino que se comportan como lesiones tóxicas focalizadas. Se ha comprobado que los depósitos de péptido β A tienen una conformación de lámina- β plegada relevante para la toxicidad *in vivo* por lo que la prevención o remoción de depósitos de péptido β A son estrategias terapéuticas potenciales (26).

La relación entre la neurotoxicidad del péptido β A y la APP no es clara pero es posible que la APP pueda modular la toxicidad del péptido β A. La formación de fibrillas de péptido β A convierte al péptido β A en una forma con alta afinidad por proteínas de membrana de las neuronas, y particularmente por la APP. En contraste, los agregados amorfos de péptido β A no muestran unión a proteínas de membrana, este resultado correlaciona bien con la ausencia de toxicidad. Existen varios mecanismos por los que APP promueve la muerte celular pero los resultados experimentales sugieren que la unión de APP y β A aumenta la toxicidad por cambios conformacionales que disparan la muerte celular (27).

El péptido β A humano difiere del de ratón en las posiciones 5, 10, 13. Los péptidos β A40 y β A42 son constituyentes de líquido cefalo raquídeo y plasma pero los niveles en pacientes con EA e individuos sanos son muy similares. La hipótesis de la cascada amiloide postula que el péptido o algunas de sus formas son neurotóxicas y que la sobre producción de la forma neurotóxica desencadena la EA (28, 29).

Como parte de la prueba multicéntrica AN1792 en pacientes con EA en grado medio o moderado, se probó en treinta pacientes una inmunización activa con péptido sintético β A42 pre-agregado mediante una inyección intramuscular y un refuerzo a las cuatro semanas. Se obtuvo suero y líquido cefalo raquídeo (LCR) y se encontró los anticuerpos anti- β A generados en respuesta a la vacunación no tienen reacción cruzada con el ectodominio de la proteína APP en la superficie celular y son específicos a depósitos de péptido β A (47). Los anticuerpos también fueron encontrados en LCR lo que demuestra su capacidad para cruzar la barrera hemato encefálica. Por otro lado, se encontró la estabilización cognitiva relevante en la vida diaria en los pacientes que presentaron anticuerpos contra placas de péptido β A (48). Estos datos sugieren que los anticuerpos contra placas de péptido β A pueden detener o retrasar el deterioro clínico y cognitivo en pacientes con la EA.

Sin embargo en enero del 2002 fue suspendida la prueba clínica AN-1792 porque algunos pacientes presentaban inflamación en el sistema nervioso central. El fármaco probado (Betablock) contenía una versión sintética del péptido β A y causaba que el sistema inmune atacara las placas neuríticas. Sin embargo se sugirió una posible respuesta autoinmune porque la APP se encuentra en muchas células normales incluyendo las neuronas (30).

En la prueba clínica AN-1792 posiblemente los anticuerpos se unieron a las placas neuríticas y se dió una condición de inflamación crónica como una respuesta aguda para acelerar la remoción del péptido β A en el cerebro. En pacientes de edad avanzada la vacunación tiene el potencial de exacerbar la neuroinflamación a través

de la invasión al cerebro de células T-citotóxicas que acelerarían la pérdida neuronal y la demencia.

Ya en 1993 se aislaron cuatro anticuerpos reactivos contra placas de péptido β A40 y vasos sanguíneos cerebrovasculares de un paciente con diagnóstico clínico de la EA. Dos de estos anticuerpos mostraron reactividad contra placas en cerebros de personas sanas y los cuatro anticuerpos obtenidos reaccionaron también con neuronas en cerebros de pacientes con EA y personas sanas. Se exploró el epítotope reactivo, encontrándolo en la región amino terminal entre los residuos 1-28 (31).

En 1996 se probaron algunos anticuerpos monoclonales para prevenir la agregación del péptido β A. Se encontró que el anticuerpo monoclonal AMY-33, que reconocía un epítotope entre los residuos 1-28 del péptido β A40, inhibía la agregación del péptido en presencia de heparan sulfato. Lo que indica que el efecto inhibitorio parecía estar relacionado con la localización del sitio de unión del anticuerpo, y que la naturaleza de los agentes agregantes (32).

Posteriormente en 1997 se demostró que el anticuerpo monoclonal 6C6 que se une a un epítotope localizado entre los residuos 1-16 tiene un efecto de solubilización significativo en fibrillas pre-formadas del péptido β A y confiere deterioro a las estructuras de las fibrillas. Este anticuerpo monoclonal previene la neurotoxicidad del péptido β A *in vitro* de manera dependiente de la concentración, lo que sugirió que los anticuerpos monoclonales de alta afinidad dirigidos a sitios específicos podrían revertir la agregación patológica del péptido β A a componentes no tóxicos (33).

Se han desarrollado varios ratones transgénicos que sobre expresan la proteína APP humana. En 1999 se inmunizaron ratones transgénicos PDAPP con péptido β A42. La inmunización en animales jóvenes esencialmente previene el desarrollo de la formación de placas de péptido β A, la distrofia neurítica y la

astrogliosis. También se demostró que el tratamiento en animales envejecidos también reduce la extensión y progresión de las neuropatías que se presentan en la EA que se presentarían sin tratamiento. Se hizo patente que la inmunización con péptido β A42 genera anticuerpos específicos anti- β A (35). En otros estudios se ha demostrado que la vacunación con péptido β A humano protege a ratones transgénicos (Tg2576 APP+PS1; TgCRND8) de las deficiencias de memoria y aprendizaje en modelos de estudio de la EA. Los ratones vacunados también presentan una reducción parcial en la carga de péptido β A y se ha observado que la respuesta inflamatoria derivada de la vacunación con péptido β A, no altera el tejido por sí mismo (38, 39). Lo que en conjunto ha permitido desarrollar la hipótesis de que una respuesta inmune específica puede reducir la patología en un modelo animal de la EA.

Posteriormente se demostró que la administración de anticuerpos policlonales y monoclonales contra el péptido β A vía inyección intraperitoneal a ratones transgénicos PDAPP semanalmente durante seis meses resulta en una reducción del 93 y 81%, respectivamente del número de placas en ausencia de inmunidad de células T. Se comprobó la entrada de los anticuerpos al sistema nervioso central y la remoción de agregados de péptido β A preexistente.

Se encontraron datos que sugieren que el reconocimiento y la remoción del péptido β A depositado es un importante componente de la eficacia de los anticuerpos *in vivo*. Se probaron F(ab)₂ del monoclonal exitoso (3D6) encontrando que *in vivo* la remoción del péptido no ocurre a través de la fagocitosis mediada por receptores Fc (36).

Se ha discutido ampliamente sobre sí la inmunización pasiva es suficiente para que los anticuerpos anti-péptido β A atraviesen la barrera hemato-encefálica y entren al CNS. Un grupo de investigación no logró detectar anticuerpos en las placas seniles (36) pero otro grupo sí lo hizo (40). La única diferencia entre ambos es la vía de administración del anticuerpo, intravenosa en el primer caso e

intraperitoneal en el segundo. Resulta concebible que la forma de administración podría influir en la capacidad de los anticuerpos de atravesar la barrera hematoencefálica, sin embargo también es concebible que los anticuerpos actúen como “precipitantes periféricos de péptido βA ” por lo que aún se requiere de trabajos adicionales para resolver la manera en que la inmunoterapia anti-péptido βA ocurre (41).

El uso de anticuerpos como agentes terapéuticos o de inmunodetección tiene aplicaciones limitadas debido a su alto costo y sus características de estabilidad, es por eso que hoy día se prefieren moléculas con la especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo pero que no tengan una base de inmunoglobulina. Para cubrir estos requisitos se emplean péptidos o fragmentos de anticuerpos (con los sitios de unión al antígeno) expresados en fagos mediante una tecnología llamada despliegue en fagos (Phage Display). La tecnología de despliegue en fagos fue desarrollada por primera vez en el bacteriófago M13 por el Dr. James D. Smith en 1985. A partir de entonces se han desarrollado numerosos sistemas de expresión tanto *in vivo* como *in vitro*. La posibilidad de expresar proteínas en la superficie de los bacteriófagos mediante el despliegue en fagos establece un vínculo entre su fenotipo y genotipo.

La tecnología de despliegue en fagos, utiliza bacteriófagos filamentosos como M13, f1 y fd, que son virus no líticos filiformes que infectan bacterias mediante el pilus-f. (49 y 51).

M13 es un bacteriófago filamentoso específico de *Escherichia coli* de aproximadamente 1 μm en longitud pero menos de 10 nm de diámetro. La partícula viral consiste en un núcleo de DNA de cadena sencilla rodeada por una envoltura de 5 diferentes proteínas. La mas abundante es la proteína 8 de aproximadamente 2700 copias, 5 copias de las proteínas 7 y 9 forman un extremo de la partícula viral mientras que otras 5 copias de las proteínas 3 y 6 constituyen el extremo opuesto.

La proteína 3 también es necesaria para el reconocimiento e infección a la célula huésped, se une al pilus F y es quien e inicia la tanslocación del DNA viral.

El genoma de M13 contiene 11 genes, cinco de estos codifican para las proteínas de envoltura mientras que el resto codifican las proteínas necesarias para la replicación y el ensamblaje viral.

La replicación es iniciada cuando pIII se une al pilus F en la superficie de una célula de *E. coli* y facilita la translocación del DNA viral al citoplasma. Dentro de la célula huésped, el DNA de cadena sencilla se convierte en la forma de doble cadena el cual es duplicado y usado como plantilla para la producción de las proteínas del fago. Eventualmente el DNA de doble cadena se usa como plantilla para la producción de nuevo DNA de cadena sencilla mediante la replicación por círculo rodante. Así, los componentes para nuevas partículas virales se acumulan dentro de la célula huésped.

Antes de ensamblar una nueva partícula viral, las proteínas de envoltura se embeben en la membrana interna, otras proteínas forman un complejo que une las membranas internas y externas mediante un poro, el DNA viral es exteriorizado por este poro y rodeado por las proteínas de envoltura que pasan de la membrana interna a ensamblar la partícula viral.

El ensamblaje del fago comienza con la incorporación de pVII y pIX para formar un extremo de la partícula, seguida por la incorporación de miles de copias de pVIII y el proceso termina con la adición de pVI y PIII en el otro extremo de la partícula. Entonces la nueva partícula viral es liberada al medio extracelular por un proceso no lítico.

El hecho de que moléculas de pVIII altamente mutadas puedan ser incorporadas a la envoltura de M13 sugiere que es posible diseñar proteínas de envoltura completamente sintéticas o artificiales para incrementar la expresión de proteínas heterólogas y mejorar el desempeño de la tecnología por sí misma (52).

La tecnología de despliegue en fagos utiliza en general seis sistemas de expresión, de tipos 3, 3+3, 33, cuando se expresan péptidos o proteínas fusionados en el extremo N-terminal a la proteína pIII del fago. Y de tipos 8, 8+8, 88, cuando se usa pVIII. En los tipos 3 y 8 todas las copias de la proteína viral (pIII/pVIII) contienen el inserto. En los tipos 3+3 y 8+8 se utiliza un plasmido de DNA llamado fagemido donde se insertan los genes de interés, luego se infectan bacterias que tienen el fagemido con fagos ayudadores (helper) que tienen los genes nativos de pIII o pVIII y se obtienen fagos recombinantes que expresan el inserto en algunas copias de pIII/pVIII. Finalmente si se incluyen en el genoma del fago tanto los genes nativos como mutantes (con el inserto de interés) de pIII/pVIII, se obtienen fagos de los tipos 33/88.

De manera general, los sistemas de expresión de tipo 3 toleran péptidos y proteínas de gran tamaño mientras que los de tipo 8 solo expresan péptidos de 6-8 aminoácidos, en tanto que los sistemas 8+8/80 soportan la expresión de proteínas más grandes generando fagos híbridos en el lugar de fagos recombinantes (51).

Una biblioteca expresada en fagos es una mezcla de fagos filamentosos con secuencias insertadas en las proteínas pVIII, pIII ó pVI, donde el péptido o proteína externos son expresados en la superficie del virión fusionada a la proteína de envoltura. Cada fago expresa solo un tipo de péptido o proteína en múltiples copias pero en una biblioteca pueden estar representados billones de péptidos diferentes. Como el vector que se utiliza para expresar el péptido o proteína de interés es una partícula viral infectiva, se pueden propagar indefinidamente bibliotecas enteras o clonas individuales.

La estructura de los fagos es extraordinariamente robusta, resiste calor, solventes orgánicos, ácidos y otros factores de estrés, su producción es muy económica y una vez purificados pueden ser almacenados indefinidamente (49).

La tecnología de despliegue en fagos ha generado anticuerpos humanos de alta calidad y ha demostrado su seguridad y eficacia en pruebas clínicas (clinical

trials). Hoy día esta tecnología es parte esencial en el descubrimiento de nuevos medicamentos.

Para nuestro mejor conocimiento, la tecnología de despliegue en fagos ha provisto aproximadamente el 30% de todos los anticuerpos humanos en el desarrollo clínico actual.

La selección de anticuerpos expresados en fagos involucra diversos factores: la capacidad para aislar o sintetizar conjuntos génicos de anticuerpos para construir bibliotecas grandes y de gran diversidad; la posibilidad de expresar fragmentos de anticuerpos funcionales en el espacio periplásmico de *Escherichia coli*; la eficiente traducción de la información en el bacteriofago y su expresión en la partícula viral.

La selección de anticuerpos de librerías de fagos consiste de dos pasos principales: bioselección (biopanning) y screening.

Durante la selección la librería de fagos se incuba con un antígeno, los fagos no afines se descartan y aquellos que presentan afinidad por el antígeno son recuperados, los que son amplificados para posteriores rondas de selección. Al final de una ronda de selección se obtiene una mezcla policlonal de anticuerpos en fagos enriquecida.

Durante la bioselección aquellas clonas que reconocen al antígeno de interés son enriquecidas mediante repetidas rondas. Como los anticuerpos aún están expresados en los fagos, pueden ser fácilmente reproducidos mediante la infección de *E. coli* (50).

La tecnología de phage display nos permite el fácil acceso al gen que codifica para el anticuerpo seleccionado porque su DNA está incorporado en el del vector y es posible expresar solamente el anticuerpo de interés sin el fago mismo (54).

Para convertir la mezcla policlonal en anticuerpos monoclonales se utiliza el screening. En este procedimiento se infectan *E. coli* con el conjunto de fagos obtenidos de la selección y se plaquean en medio sólido selectivo y se pica cada colonia por separado para obtener clones de scFv de anticuerpos monoclonales de alta especificidad.

Los fragmentos de anticuerpo Fab y scFv se han convertido en alternativas de las inmunoglobulinas muy atractivas para aplicaciones terapéuticas debido a que no presentan interacciones con los receptores Fc (unión/activación), tienen una alta tasa de penetración en los tejidos y a que pueden ser producidos rápidamente en procariontes. Su vida media es corta pero puede extenderse mediante la conjugación con moléculas de polietilenglicol (PEG) como en el caso de los terapéuticos CDP870 (Celltech, Inglaterra) y pexelizumab (Alexion, EUA) (50).

Los anticuerpos son componentes muy importantes del sistema inmune y su aplicación en medicina tiene muchas décadas de historia, por lo que expresar fragmentos de anticuerpos en fagos se ha convertido en una parte muy importante en la tecnología de despliegue en fagos.

Según el origen de los genes de las regiones variables pesada (V_H) y ligera (V_L) de una inmunoglobulina, existen tres principales tipos de bibliotecas de anticuerpos expresados en fagos: inmune, no-inmune o naive y sintética. Las bibliotecas inmune y no inmune o naive se utilizan genes V de células B de un animal inmunizado (o de un paciente) o los genes Ig V de individuos sanos respectivamente. Para las bibliotecas sintéticas se construyen mediante la clonación por PCR de segmentos de genes V de líneas germinales y se diversifican con clonaciones de oligonucleótidos.

La utilización de fagos que expresan epitopes como inmunógenos ha resultado ventajosa comparada con los péptidos sintéticos debido a que los fagos por sí mismos son altamente inmunogénicos capaces de activar células T

ayudadoras y no necesitan adyuvante. El primer estudio que demuestra el uso efectivo de fagos como vacuna fue reportado en 1997, cuando se expresó mediante phage display un epítipo de célula B de la glicoproteína G del virus sincisial respiratorio humano y se utilizó como vacuna para conferir protección contra la infección del virus en ratones. En 1998 se comprobó la protección de ratones neonatales contra una infección estreptococcal mediante la inmunización materna con scFv anti-idiotípicos expresados en fagos y en 1999 el grupo del Dr. Manoutcharian expresó en M13 el dominio V_H Ig con las tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) reemplazadas con epítopes de células T de *Taenia crassiceps* y demostró que la inmunización con los fagos presentaba una respuesta inmune celular protectora. Estas y otras observaciones referente al uso de fagos en humanos indican que los fagos en general y los fagos recombinantes que expresan moléculas biológicamente relevantes son candidatos muy prometedores para ser una nueva generación de vacunas (51).

La tecnología de despliegue en fagos se ha utilizado para encontrar moléculas de muchos tipos con altas afinidades: anticuerpos, péptidos (lineales y estructurales) de bibliotecas sintéticas, proteínas variadas distintas de anticuerpos y proteínas de bibliotecas de cDNA. Esta tecnología se lleva a cabo *in vitro* pero también hay reportes *in vivo* (51), lo que permite la selección de clonas altamente específicas incluso hacia moléculas en distintos estados de modificaciones postraduccionales. También es posible llevar a cabo mutagénesis para obtener moléculas más afines y construir bibliotecas de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos hacia antígenos para los que el sistema inmune no son antígenicos.

A pesar de que la construcción de una biblioteca mediante el despliegue en fagos resulta laboriosa, ésta puede ser replicada indefinidamente sin perder su calidad y muchas metodologías pueden ser automatizadas. Finalmente las clonas seleccionadas pueden verificarse en pruebas de afinidad y especificidad mediante muchos procedimientos bioquímicos estándar.

La tecnología de despliegue en fagos ha sido la única que provee pruebas que permiten la cuantificación de diferentes proteínas y de sus estados en muestras

biológicas complejas, por lo que es utilizada en campos tan específicos como la farmacogenómica para delinear la conexión entre la eficacia de un fármaco y los diversos alelos de la proteína blanco de ese fármaco (53).

La técnica de hibridoma para producir anticuerpos monoclonales está restringida a utilizar ratones como huéspedes inmunológicos, en contraste, la tecnología Phage Display permite usar el repertorio inmunológico original o después de una inmunización de cualquier animal huésped. El único pre-requisito es que los genes de las inmunoglobulinas permitan su amplificación por PCR. Una vez amplificados los genes se transfieren a un vector de expresión que se usa para transformar *E. coli*, que producen y liberan fagos que contienen el DNA del vector y que expresan la proteína en sus superficies. Al utilizar bacteriofagos se aprovecha que los fagos solo pueden infectar *E. coli* con el pilus F, que cada célula huésped solo puede ser infectada por un solo fago y que el tamaño del DNA puede variar considerablemente.

Mediante la tecnología de despliegue en fagos se pueden generar dos tipos de anticuerpos: Fragmentos de unión a antígeno (Fab), o Fragmentos variable de cadena sencilla (scFv). Para los Fab solo la cadena pesada es fusionada a la proteína pIII mientras que la cadena ligera es codificada en un vector por separado, o en el mismo vector, el puente disulfuro necesario para unir las dos cadenas se establece en el periplasma de la bacteria. Para los scFv, solo se expresan los fragmentos variables de las cadenas pesada y ligera conectadas mediante un péptido de unión.

Utilizando el despliegue en fagos se pueden alcanzar 10^9 fagos recombinantes en una biblioteca y su tamaño se puede extender hasta 10^{18} mediante la adición de respuestas inmunes inmortalizadas del mismo o diferentes antígenos en el mismo o diferente huésped. Sin embargo el tamaño de la biblioteca no necesariamente refleja la diversidad de las clonas (54).

La tecnología de despliegue en fagos tiene una limitación impuesta por la relativa baja eficiencia de transformación (la eficiencia con que el DNA puede ser

introducido en células de *E. coli*) que impone topes en el tamaño de las librerías de aproximadamente 10⁹ recombinantes. Debido a esto, muchos grupos buscan nuevas alternativas como la expresión en la superficie bacteriana, en levaduras, la utilización de virus eucariotes o directamente mediante plásmidos de DNA, sin embargo las tecnologías *in vitro* como el covalent display y el ribosome display parecen ser más prometedoras porque no dependen de la transformación ni de la expresión en *E. coli* (55).

Un evento importante para desarrollar la tecnología de expresión molecular, como el despliegue en fagos, fue la selección simultánea de los genes que codifican una proteína y que esa proteína tuviera una especificidad deseada. Por otro lado se encontró que los anticuerpos completos no son funcionales cuando se expresan en bacterias pero los fragmentos de anticuerpos (Fab y scFv) si permanecen funcionales cuando se expresan en *E. coli* debido a que el periplasma de la bacteria simula el ambiente oxidante del retículo endoplásmico. En 1990 McCafferty et al. mostraron que los fragmentos de anticuerpo podían ser expresados en la superficie de partículas de fago mediante la fusión de los genes variables de los anticuerpos a una de las proteínas del fago. Los anticuerpos expresados en fagos que son específicos para un antígeno de interés pueden ser enriquecidos posteriormente por múltiples rondas de selección por afinidad (al antígeno) debido a que la partícula del fago lleva el gen que codifica el anticuerpo expresado. Esto se reportó por primera vez para fragmentos de anticuerpos scFv en 1990 (McCafferty, et al.). A principios de la década de los 90 Winter et al. demostraron que la tecnología phage display podía ser utilizada para seleccionar anticuerpos específicos para un antígeno de bibliotecas hechas de células B de bazo de ratones inmunizados (56).

La tecnología de despliegue en fagos permite también madurar la afinidad de los anticuerpos de interés mediante estrategias aleatorias o bien por mutagénesis dirigida para obtener mayor afinidad que los anticuerpos generados *in vivo*, sin embargo estos procedimientos podrían estar acompañados de la aparición de una especificidad muy delicada o reactividad cruzada no deseada (56).

Los anticuerpos son inmunoterapéuticos muy confiables, fáciles de producir, bien tolerados y de buen comportamiento clínico. Mediante el re-arreglo de los dominios variables y bioselección de anticuerpos de ratón se puede generar una versión humana con similares características de afinidad, otra alternativa es el proceso de humanización (56).

La fuente de los dominios de los genes variables y los tipos de CDRs incluidos determinarán la especificidad y frecuencia de clonas específicas a un antígeno de interés como la calidad (afinidad y frecuencia de mutaciones de nucleótidos) de las clonas seleccionadas. Se pueden seleccionar más fácilmente anticuerpos altamente afines a un antígeno inmunogénico a partir de bibliotecas inmunes mientras que las bibliotecas sintéticas y no inmunes son útiles como fuentes de anticuerpos a muchos diferentes antígenos. El formato de expresión también influye en los resultados de la selección, por lo que se prefiere utilizar la fusión a pIII en fagemidos porque permite alta frecuencia de expresión monovalente y la fácil conversión de anticuerpos expresados en fagos a anticuerpos solubles secretados (56).

Los sistemas de fagemidos permiten la expresión de polipéptidos que no pueden ser expresados en sistemas de expresión simple debido a que los efectos deletéreos de las proteínas de fusión son atenuados por la presencia de proteínas de envoltura del fago ayudador de tipo silvestre. Por esto actualmente se ha logrado la expresión funcional de polipéptidos en las cinco proteínas de envoltura del fago mediante sistemas fagemidos. A la fecha existen reportes que demuestran que la envoltura del fago es extremadamente tolerante a la adición de nuevas proteínas y estas proteínas pueden ser específicamente modificadas para mejorar el despliegue en los fagos. Existen bibliotecas de péptidos expresadas en fagos que pueden ser usadas para aislar péptidos que se unen con alta especificidad y afinidad a prácticamente cualquier proteína de interés. Estos péptidos pueden ser utilizados como reactivos para entender el reconocimiento molecular o como moléculas para el diseño de fármacos. En este contexto se ha demostrado que muchos péptidos

identificados mediante bibliotecas en fagos se unen a estructuras tridimensionales biológicamente relevantes por lo que han sido utilizados para identificar nuevos sitios para el diseño de inhibidores enzimáticos. Existen diferentes tipos de bibliotecas expresadas en fagos que son de utilidad para investigar diferentes tipos de interacciones de unión proteína – proteína y ácido nucléico – proteína. En los últimos años se han construido bibliotecas de fragmentos de anticuerpo que se han convertido en herramientas prácticas para la investigación de nuevos fármacos, debido a que los anticuerpos generados en fagos pueden someterse a procesos de humanización y maduración de afinidad, por lo que muchos anticuerpos generados en fagos se encuentran en pruebas clínicas muy avanzadas. También existen bibliotecas de cDNA expresadas en fagos que se utilizan para identificar los pares complementarios de ligandos que no han podido ser identificados, otra aplicación importante es el mapeo a detalle de interacciones proteína – proteína con métodos de energética de unión (57).

Los procesos biológicos que conducen el envejecimiento son muy complejos y para lograr un mejor entendimiento deben considerarse factores como la pérdida de la función relacionada con la edad, la información genética, la regulación post-transcripcional y las tasas de degradación de las proteínas.

En años recientes, mediante el uso del despliegue en fagos, se han identificado antígenos que presentan un patrón de expresión relacionado con la edad y de algunas enfermedades relacionadas con la esta (58).

OBJETIVO GENERAL

Selección y caracterización de anticuerpos anti-péptido βA_{42} dirigidos contra epítomos lineales y/o conformacionales, a partir de la primera biblioteca inmune anti-péptido βA_{42} de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) murinos expresada en el bacteriofago M13.

OBJETIVOS PARTICULARES

i) Construcción de una biblioteca de scFv de anticuerpos expresada en el bacteriofago M13 a partir del mRNA de los esplenocitos de ratones inmunizados con péptido βA_{42} .

ii) Selección de scFv de anticuerpos con todas las especificidades posibles contra los epítomos lineales y/o conformacionales presentes en las fibrillas de péptido βA , involucradas en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, a partir de la biblioteca construida.

iii) Caracterización de los scFv de los anticuerpos seleccionados mediante el análisis de secuencias y estudios de reconocimiento al péptido βA_{42} en ensayo de ELISA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Inmunización de ratones BALB/c con péptido βA_{42} y evaluación de la respuesta inmune humoral.

Para obtener una fuente génica de inmunoglobulinas se inmunizaron tres ratones singénicos hembras BALB/c de seis semanas de edad con péptido βA_{42} (Bachem, EUA). El péptido fue resuspendido a 2 mg/ml en agua libre de pirógenos tipo I y mezclado con PBS 10X hasta obtener PBS 1X. Esta mezcla se incubó durante toda la noche a 37° C, y se preparó una mezcla fresca antes de cada inmunización.

Para la primera inmunización se utilizó la preparación de péptido βA_{42} con adyuvante completo de Freund (Sigma, EUA) en proporción 1:1, mientras que para los refuerzos subsecuentes se utilizó la preparación de péptido βA_{42} con adyuvante incompleto de Freund (Sigma, EUA). Se realizaron cuatro inmunizaciones subcutáneas a intervalos de 14 días.

Como lote control se utilizaron tres ratones singénicos hembras BALB/c de seis semanas de edad a los que se inmunizó solamente con PBS 1X y adyuvante en lugar de la preparación inmunogénica siguiendo el mismo protocolo de inmunización.

Una semana después de la cuarta inmunización se obtuvo suero de los ratones mediante punción del plexo retroorbital y se evaluó en un ensayo de ELISA la presencia de anticuerpos específicos anti-péptido βA_{42} .

Para esto se sensibilizó una placa de titulación de 96 pozos (Maxisorb, Nunc, Dinamarca) con 1 μ g/ml de péptido βA_{42} en amortiguador de fosfatos pH 7.8

(PBS) durante toda la noche a 4 °C. La placa se lavó 4 veces con PBS con Tween 20 (Sigma, EUA) al 0.1% (PBS-Tween) y se aplicó solución bloqueadora (Zymed, EUA) por 1 h a 37 °C. Se efectuaron 4 lavados con PBS-Tween, se adicionaron los sueros de los ratones en dilución 1:200 en PBS con albúmina de suero bovino (Sigma, EUA) al 1% (PBS-BSA) y se incubó la placa por 1 h a 37 °C. Se lavó la placa 4 veces con PBS-Tween y se agregaron anticuerpos de cabra anti-IgG murinas conjugados con la enzima HRP (Zymed, EUA) en dilución de 1:5000 en PBS-BSA y se incubó la placa por 1 h a 37 °C. La placa se reveló mediante la adición del sustrato 2,2' - azino-bis/3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid (Zymed, EUA) en solución única (ABTS). Se obtuvieron lecturas de DO registrando a 405 nm mediante un lector de microplacas Oplsys MR (Dynex, USA).

Extracción de mRNA total de los ratones inmunizados con péptido βA_{42} .

Se extrajo el mRNA total de los esplenocitos y nódulos linfáticos inguinales de los ratones inmunizados anteriormente mediante el juego de purificación Quick Prep mRNA (Amersham Pharmacia Biotech, EUA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Se disectaron los nódulos linfáticos inguinales y el bazo de los ratones inmunizados y se perfundieron con PBS 1X estéril frío para obtener una suspensión celular que se precipitó por centrifugación a 200 X g. Se resuspendió en amortiguador de extracción y se pasó por una jeringa de calibre 21 para lisar las células. El lisado celular se estabilizó con amortiguador de elusión y se centrifugó a 12000 X g por 10 minutos. Una vez equilibrada la columna (Oligo (dT)-cellulose spun column) se transfirió a ella el lisado celular y se centrifugó a 350 X g por 2 minutos. Para lavar la columna se aplicó tres veces amortiguador de alta sal y se centrifugó a 350 X g durante 2 minutos cada vez. Posteriormente se lavó la columna dos veces con amortiguador de baja sal y se centrifugó a 350 X g durante 2 minutos cada vez. Se eluyó la columna con amortiguador de elusión pre-calentado

a 65 °C mediante centrifugación a 350 X g durante 2 minutos tres veces. Se precipitó el mRNA con acetato de potasio (2.5 M, pH 5.0) – glicógeno (5mg/ml) – etanol absoluto a -80 °C durante toda la noche, se centrifugó a 12000 X g por 5 minutos a 4 °C y se resuspendió en H₂O-DEPC (Dietilpyrocarbonato 0.1%) estéril.

Síntesis de la primera cadena de cDNA.

Para sintetizar la primera cadena de cDNA a partir del mRNA de los ratones inmunizados con péptido β A42 se utilizó el juego de síntesis First strand cDNA (Pharmacia Biotech, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para obtener cDNA que se amplifica mediante PCR sin llevar a cabo la reacción de Gubler-Hoffman, se utilizó el primer de hexadeoxinucleótidos aleatorios pd(N)₆, la mezcla de reacción, solución DTT y se incubó la reacción a 37 °C por 1 hora.

Amplificación de los genes V_H y V_L mediante PCR.

Para la construcción de los scFv se utilizó el Mouse scFv module / RPAS (Amersham Pharmacia Biotec, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se utilizó el cDNA obtenido mediante el procedimiento anterior en dos reacciones de PCR diferentes, una con Taq DNA polimerasa (Gibco, EUA) y light primer mix y la otra con Taq DNA polimerasa y heavy primer 1 y 2. Se realizaron 30 ciclos de amplificación en un termociclador Perkin-Elmer 9600.

Los productos de PCR se purificaron mediante electroforesis en un gel Tris-EDTA agarosa 1.5% (TAE) con amortiguador TAE 0.5X a 80 V DC. Se utilizaron dos hojas de bisturí estériles para remover las bandas de DNA de 340 pb (VH) y 325 pb (VL) y dos columnas MicroSpin para eluir el DNA del gel por centrifugación a 735 X g durante 2 minutos.

Ensamblaje de los fragmentos variables de cadena sencilla (scFv).

En la reacción de ensamblado se utilizaron un linker DNA (linker primer mix), que se alinea con los productos de PCR de cadena pesada (50 ng) y con los productos de PCR de cadena ligera (50 ng) y sirven como primers a una reacción de llenado en presencia de Taq DNA polimerasa y una mezcla de dNTPs durante 7 ciclos en un termociclador GENEAMP (Biorad, EUA).

Inmediatamente se amplificaron por PCR los scFv recién ensamblados mediante la adición de Taq DNA polimerasa, dNTP mix y el RS primer mix que les adiciona los sitios de restricción 5' Sfi I y 3' Not I para su posterior clonación en un vector de expresión. Se utilizaron 30 ciclos de amplificación en el termociclador GENEAMP.

Se purificó el DNA del repertorio del scFv recién generado mediante electroforesis en gel TAE 1.5% del que se removió la bada de DNA de 750 pb. Se utilizó una columna MicroSpin y resina sephacryl (S-400 HR) y se centrífugo a 735 X g durante 2 minutos para eluir el DNA.

Se reamplificó mediante PCR el DNA de los scFv (20 ng) con RS primer mix, dNTP mix, Taq DNA polimerasa y amortiguador para PCR durante 30 ciclos de amplificación en el termociclador GENEAMP.

Los productos de PCR se purificaron por electroforesis en gel TAE 1.5% y una columna MicroSpin con resina sephacryl. El DNA de los scFv se cuantificó en una electroforesis en gel TAE 1.5% con el scFv Marker por comparación visual.

Se digirió el DNA de los scFv (1.75 µg) con la enzima de restricción Sfi I (Amersham Pharmacia Biotech, EUA) en amortiguador M durante 6 horas a 50 °C en el termociclador GENEAMP.

Se purificó el DNA de la reacción de digestión mediante el juego de purificación GFX PCR DNA and gel band (Amersham Pharmacia Biotech, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se adicionó amortiguador de captura a la reacción y se colocó en la columna GFX, se centrífugo por 30 segundos a 12000 X g, se lavó la columna con amortiguador de lavado por centrifugación 30 segundos a 12000 X g y se eluyó el DNA en agua destilada estéril, se incubó 1 minuto a temperatura ambiente y se centrífugo a 12000 X g por 1 minuto.

Se digirió el DNA de los scFv (1.5 µg) con la enzima de restricción Not I (Amersham Pharmacia Biotech, EUA) en Amortiguador H con BSA y Tritón X-100 durante toda la noche a 37 °C.

Se purificó el DNA de los scFv Sfi I / Not I mediante el juego de purificación GFX PCR DNA and gel band.

Expresión de la biblioteca de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) en el bacteriofago M13.

Se llevaron a cabo 8 reacciones de ligación del DNA de los scFv (150 ng) con el vector fagémido pCANTAB 5 E (250 ng) con T4 DNA ligasa (Invitrogen, EUA) y amortiguador de reacción. La reacción se incubó por 1.5 h a 22 °C.

Se hizo un pool con todas las reacciones de ligación, se precipitó el DNA con acetato de potasio – glicógeno – etanol y se resuspendió en agua destilada estéril.

Se prepararon células *E. coli* TG1 electrocompetentes mediante el protocolo modificado de Sambrook-Russell (79).

Se inocularon 15 ml de medio 2X YT con una colonia de *E. coli* TG1 de una caja con medio mínimo y se incubó durante toda la noche a 37 °C en agitación (250 rpm). De este nuevo cultivo se inoculó 1/10 en medio 2X YT y se creció a 37 °C en agitación hasta una DO de 0.7 a 600 nm. Se centrifugó durante 10 minutos a 3000 X g y se resuspendió en 500 ml de glicerol 10% frío. Se centrifugó nuevamente y se resuspendió en 250 ml de glicerol frío. Se centrifugó por tercera vez y se resuspendió en 125 ml de glicerol frío. Se realizó una última centrifugación y se resuspendió en 2.5 ml de glicerol frío. Se realizaron alíquotas y se congelaron a -70 °C.

Se electroporó el pool de las reacciones de ligación (15 pg cada vez) en alíquotas de 50 µl de bacterias *E. coli* TG1 electrocompetentes a 25 µF, 200 Ω, 1.8 KV en un sistema Gene Pulser II (Bio-Rad, EUA). Se utilizó 1 ml de medio 2X YT por cada 2 reacciones y se concentraron en tubos de 50 ml para su rescate. Se creció por 2 h a 37 °C en agitación y se le adicionó glucosa (2%) y ampicilina (100 mg/ml). Se creció por 2 h a 37 °C en agitación. Se infectó con el fago helper M13KO7 (Invitrogen, EUA) y se incubó 1 h a 37 °C. Se centrifugó por 15 minutos a 1000 X g y se resuspendió en medio 2X YT con ampicilina (100 mg/ml) y kanamicina (50 mg/ml) y se dejó creciendo durante toda la noche a 37 °C en agitación.

Se centrifugó a 10000 X g durante 20 minutos y se colectó el sobrenadante con los fagos recombinantes que se refrigeró a 4 °C con 1/6 NaCl (2.5 M) PEG-8000 (20% w/v). Se centrifugó a 10000 X g a 4 °C durante 10 minutos y se resuspendió de TBS estéril. Se precipitó con 1/6 de NaCl PEG durante toda la noche a 4 °C. Se centrifugó a 12000 X g durante 15 minutos a 4 °C y se resuspendió en TBS. Se hicieron alíquotas de la biblioteca y se refrigeraron con 1/3 de glicerol a -80 °C. Se tituló la biblioteca en células *E. coli* TG1 y medio LB-agar con ampicilina y glucosa.

Selección de los fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) anti péptido β A por bioselección.

Para llevar a cabo la bioselección y amplificación se utilizaron los protocolos modificados de Gevorkian *et. al.* 1998, 2000 (60, 61) y Manoutcharian *et. al.* 1999 (62).

Se sensibilizó una placa de 96 pozos usando 200 ng / pozo en cuatro pozos con una solución de péptido β A durante toda la noche. Se realizaron 4 lavados con PBS-Tween. Se bloqueó la placa con PBS-BSA durante 1 h a 37 °C. Se realizaron 4 lavados con PBS-Tween. Se agregó la biblioteca en concentración de 10^{13} fagos / ml, se incubó la placa durante 1 h a 4 °C y 1.5 h a temperatura ambiente (TA). Se realizaron 8 lavados con PBS-Tween y 4 lavados con PBS. Se eluyeron los fagos con Glicina-HCl (2 M pH 2.2) durante 10 minutos a temperatura ambiente y 5 minutos a 37 °C. Se neutralizó con Tris-HCl (1 M, pH 9.1). Los eluidos se titularon en células *E. coli* TG1 y medio LB-agar con ampicilina y glucosa.

Rescate y amplificación de fagémidos

Después de cada ronda de bioselección se rescató el eluido infectando un cultivo fresco de células *E. coli* TG1 en medio 2X YT con ampicilina y glucosa con fago helper M13KO7. Se incubó por 1 h a 37 °C. Se centrifugo por 15 minutos a 1000 X g y se resuspendió en medio 2X YT con ampicilina y kanamicina, se dejó creciendo durante toda la noche a 37 °C en agitación. Se centrifugo a 10000 X g durante 20 minutos y se refrigeró el sobrenadante durante 2 h a 4 °C con 1/6 NaCl PEG-8000. Se centrifugo a 10000 X g a 4 °C durante 10 minutos y se resuspendió en TBS estéril. Se precipitó con 1/6 de NaCl PEG durante toda la noche a 4 °C. Se centrifugo a 12000 X g durante 15 minutos a 4 °C y se resuspendió en TBS.

Los rescates de los eluidos se titularon en células *E. coli* TG1 y medio LB-agar con ampicilina y glucosa.

ELISA - screening de los scFv en fagos seleccionados.

El ELISA - screening se realizó mediante los protocolos modificados del Expression Module / RPAS (Amersham, Pharmacia, Biotech, EUA) y O'Connell, *et. al.* 2002 (59).

Se tomaron eluidos de la segunda y tercera ronda y se plaquearon en células TG1 y medio LB-agar con ampicilina y glucosa. Se seleccionaron al azar 37 colonias individuales de la segunda ronda y 56 colonias individuales de la tercera ronda y se inocularon en dos placas de cultivo celular de 96 pozos (Costar, EUA) con 2X YT ampicilina y glucosa, la placa que se inoculó primero sirvió como placa maestra y la que se inoculó después como placa de trabajo. Ambas placas se incubaron a 30 °C durante toda la noche. La placa maestra se selló y se refrigeró a -20 °C. La placa de trabajo se rescató incubando con Hiperfago (Progen, Alemania) en 2X YT durante 30 minutos sin agitación y 30 minutos con agitación. Posteriormente la placa se centrífugo a 1500 X g durante 20 minutos y se resuspendió con 2X YT con ampicilina y kanamicina. La placa se creció durante toda la noche a 30 °C en agitación posteriormente se centrífugo a 1500 X g durante 20 minutos y se tomó el sobrenadante de cada pozo con los fagos recombinantes para evaluarlos en ELISA.

Se sensibilizó una placa de 96 pozos (Nunc, Dinamarca) con una preparación de péptido β A. La placa se bloqueó como se describe anteriormente y se adicionaron los sobrenadantes de la placa de trabajo. Se incubó durante 1 h a 37 °C y se realizaron 4 lavados con PBS-Tween y 4 lavados con PBS. Se adicionó el anticuerpo monoclonal anti-M13 conjugado con la enzima HRP (Amersham, Pharmacia, Biotech, EUA) en PBS-BSA y se incubó la placa por 1 h a 37 °C. Se realizaron 4 lavados con PBS-Tween y 4 lavados con PBS y se adicionó solución

única ABTS (Zymed, EUA). Se registraron lecturas de DO a 405 nm en el lector de microplacas Opsys MR.

Las clonas reactivas obtenidas mediante el ELISA se rescataron y amplificaron para probarse nuevamente en ensayo de ELISA contra péptido β A como se describe anteriormente. Adicionalmente se analizaron por PCR para identificar insertos de DNA de los scFv (800 pb).

Secuenciación de DNA de las clonas reactivas.

Se purificó el DNA de doble cadena de las clonas reactivas mediante un sistema de purificación Miniprep (Quiagen, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se amplificó cada una de las clonas reactivas y se centrífugo a 1200 X g. Se resuspendió con amortiguador P1 y se transfirió a un tubo limpio. Se adicionó amortiguador P2 y se mezcló. Se agregó amortiguador N3 y se mezcló. Se centrífugo a 12000 X g y se aplicó el sobrenadante a la columna QIAprep spin se centrífugo durante 1 minuto y se lavó la columna con amortiguador PB por centrifugación durante 1 minuto. Se lavó la columna con amortiguador PE mediante centrifugación por 1 minuto y se centrífugo 1 minuto más para secar la columna. Para eluir la columna se incubó con agua destilada estéril durante 1 minuto y se centrífugo por 1 minuto más.

Se utilizó un secuenciador automatizado ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, EUA) y el juego de primers para secuenciación pCANTAB5 (Amersham, Pharmacia, Biotech, EUA). La secuenciación se llevó a cabo en la Unidad de Secuenciación Automatizada del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Las secuencias de DNA obtenidas se analizaron mediante las herramientas bioinformáticas: ExpASy en el servidor de Biología Molecular

<http://www.expasy.ch/tools/> , BLAST en el servidor
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast> e IMGT en el servidor
<http://www.imgt.cines.fr>

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este estudio forman parte del artículo:
“Manoutcharian K., Acero G., Munguia M.E., Montero J.A., Govezensky T., Cao C., Ugen K., Gevorkian G. 20003. *Amyloid-beta peptide-specific single chain Fv antibodies isolated from an immune phage display library*. Journal of Neuroimmunology. Vol 145. pags 12-17.” (Apéndice 1).

Construcción de la biblioteca de anticuerpos scFv anti-péptido βA_{42} expresada en fago M13.

La preparación de la biblioteca de anticuerpos scFv expresada en fagos involucró cuatro etapas:

- i) El aislamiento del mRNA total de los nódulos linfáticos inguinales y esplenocitos de ratones inmunizados con el péptido βA_{42} .
- ii) La preparación de los repertorios génicos V_H y V_L a partir de este mRNA, para lo que se utilizaron reacciones de RT-PCR, PCR, alineamiento y ensamblaje de DNA.
- iii) La clonación de estos repertorios en el vector de expresión fagémido pCANTAB 5 E, donde se utilizaron los sitios de restricción Sfi I y Not I.
- iv) La expresión en la superficie de partículas virales de M13, que infectan células *E. coli* TG1.

Se calculó una diversidad de 2.2×10^5 fagos recombinantes para la biblioteca de anticuerpos scFv anti-péptido βA_{42} expresada en el bacteriofago M13.

Bioselección de la biblioteca de anticuerpos scFv anti-péptido

βA_{42} .

Para identificar clonas reactivas al péptido βA_{42} en la biblioteca de anticuerpos scFv anti-péptido βA_{42} se realizaron tres rondas de bioselección con el péptido βA_{42} inmovilizado en placa (Tabla 1).

Ronda de bioselección	Título de entrada (ufp/ml)	Título de salida (ufp/ml)	Relación entrada/salida
1	5.00×10^{12}	4.00×10^3	8.00×10^{-10}
2	7.00×10^{12}	6.00×10^3	8.57×10^{-10}
3	8.00×10^{12}	3.00×10^3	3.75×10^{-10}

Tabla 1. Títulos de los eluidos en cada ronda de bioselección. El título de entrada corresponde al usado para la bioselección y el de salida al título obtenido de cada ronda de bioselección.

Se seleccionaron aleatoriamente 37 clonas de la segunda ronda y 56 de la tercera ronda de bioselección las cuales se probaron mediante ELISA screening.

ELISA screening de los eluidos de la segunda y tercera ronda de bioselección.

Mediante el ELISA screening se identificaron las clonas reactivas al péptido βA_{42} a partir de las clonas de la segunda y tercera ronda de bioselección (Gráfico 1 y 2).

Se seleccionaron como positivas las clonas AM2.9 y AM2.32 de la segunda ronda de bioselección, así como las clonas AM3.3, AM3.10, AM3.22 y AM 3.53 de la tercera ronda. Se seleccionó al azar la clona AM3.26 como clona negativa.

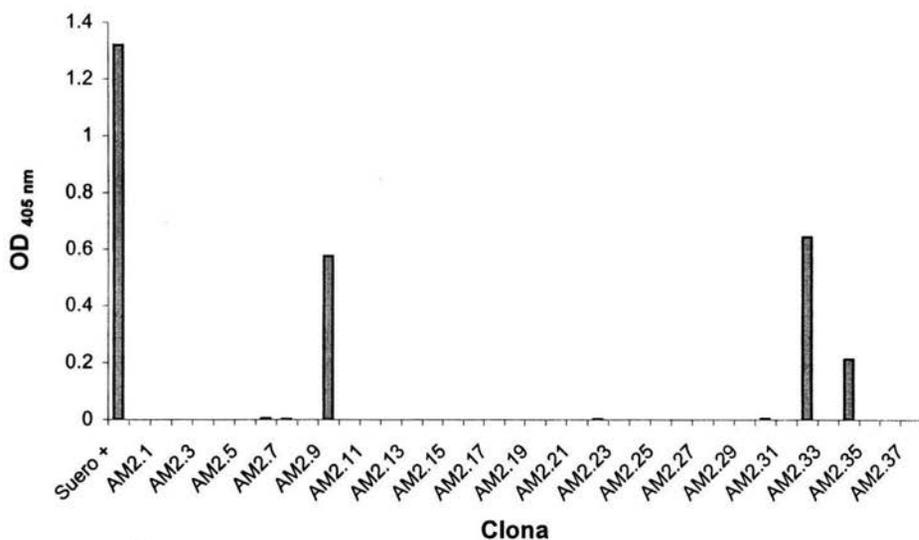


Grafico 1. ELISA screening con péptido βA_{42} fijo en la placa y clonas de la segunda ronda de bioselección. Se utilizó suero anti-péptido βA_{42} como control positivo.

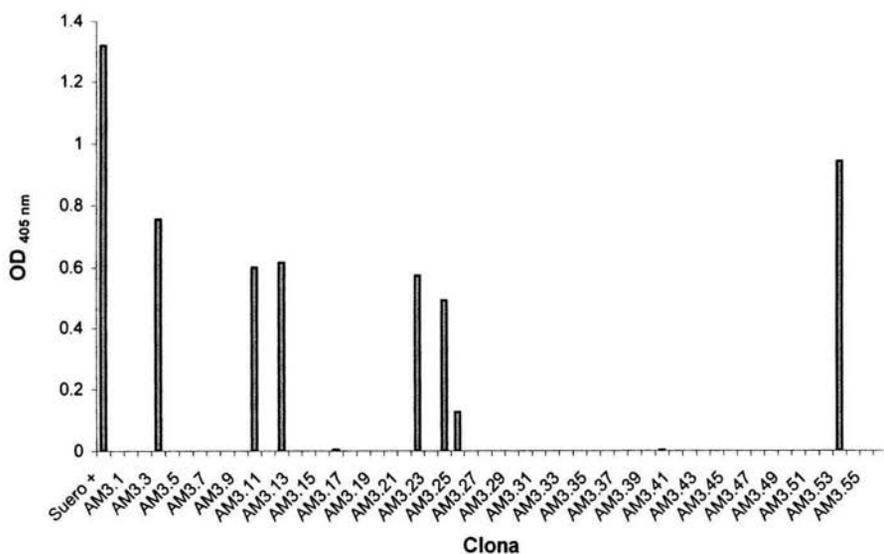


Grafico 2. ELISA screening con péptido βA_{42} fijo en la placa y clonas de la tercera ronda de bioselección. Se utilizó suero anti-péptido βA_{42} como control positivo.

Se realizó un análisis por PCR para determinar si las clonas positivas presentaban DNA de los scFv y se determinó que todas las clonas tenían insertos del tamaño adecuado (Figura 1).

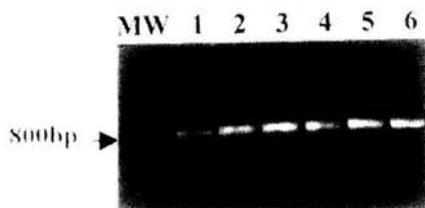


Figura 1. Análisis por PCR de las clonas positivas. Gel de TAE-agarosa 1.5 x con tinción de bromuro de etidio e iluminación UV.

Cuando se probaron las clonas amplificadas con los títulos homologados a 10^{10} ufc/ml en un ensayo de ELISA, utilizando el péptido βA_{42} inmovilizado en la placa, se encontró que la clona AM3.26 es positiva (Gráfica 3).

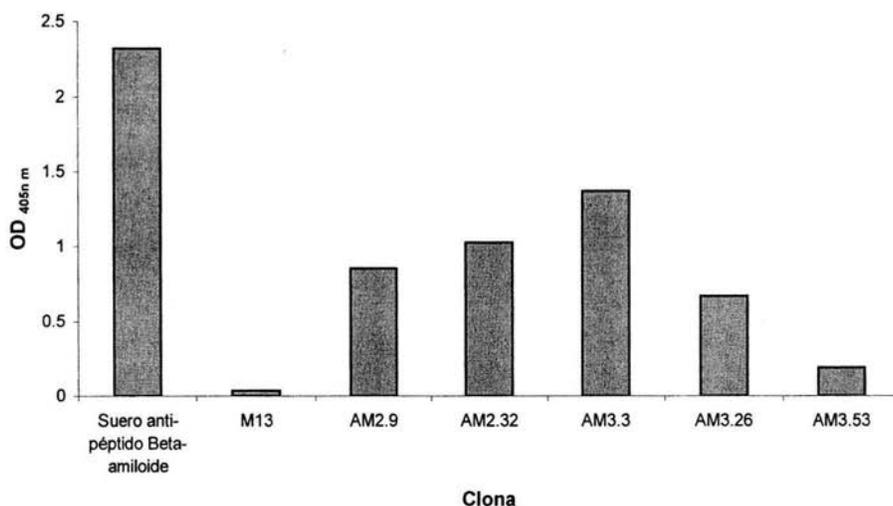


Gráfico 3. ELISA con péptido βA_{42} fijo a la placa y las clonas positivas en el ELISA screening. Se utilizó suero anti-péptido βA_{42} como control positivo y fago M13 silvestre como control negativo.

Al realizar la amplificación de las clonas seleccionadas, las clonas AM3.10 y AM3.22 no presentaron crecimiento. Debido a que la clona AM3.53 es la única que presenta una absorbancia menor a 0.5 DO, se decidió no considerarla para los estudios subsecuentes.

Secuenciación de las clonas reactivas

Se analizaron las secuencias de nucleótidos de los scFv de las clonas AM2.9, AM2.32 y AM3.3 y se encontró que eran idénticas (*i.e.* la misma clona), por lo que se decidió nombrarla AM2.9. La clona AM3.26 se identificó como una clona independiente (Tabla 2).

Las secuencias de amino ácidos se dedujeron a partir de la secuencia de nucleótidos de cada clona (Tabla 3).

Se encontraron 5 diferencias en diversas regiones de las secuencias de amino ácidos de las clonas AM2.9 y AM3.26 originadas por 6 diferentes nucleótidos (Tabla 4). Así mismo se encontraron 10 diferencias en las secuencia de nucleótidos en las posiciones 9, 16, 24, 264, 318, 358, 402, 408, 417, 432 y 603 que no generan cambios en la secuencia de aminoácidos.

Se encontró un codón de paro UGA en la clona AM2.9 y un codón de paro UAA en la clona AM3.26. Lo más probable es que estos codones de paro sean traducidos en los ribosomas incorporando triptófano (W) en la cadena polipéptica.

Las secuencias de las clonas AM2.9 y AM3.26 se registraron en el GenBank con los números AY307932 y AY307933 respectivamente. Posteriormente se analizaron mediante las herramientas bioinformáticas Expasy y BLAST, y se alinearon a las secuencias génicas de líneas germinales con mayor homología mediante la herramienta IMGT/DNA PLOT (Tabla 5).

Clona	Secuencia de nucleótidos de los scFv anti péptido βA_{42}
AM2.9 GenBank AY307932	CAGGTGAAACTGCAGGAGTCTGGGACTGAAGTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGA AGTTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACATCTTCACAAGTTATGATATAGACTGGGTG AGGCAGACGCCTGAACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTTTCTGGAGAGG GGAGTACTGAATCAATGAGAAGTTCAAGGGCAGGGCCACACTGAGTGTAGACAA GTCTCCAGCACAGCCTATATGGAGCTCACTAGGCTGACATCCGAGGACTCTGCT GTCTATTTCTGA*GCTAGAGGGGACTACTATAGGCGCTACTTCGACTTGTGGGGCC AAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAAGTGGAGGCGGTTCCAGGCGGAGGTGGCT CTGGCGGTGGCGGATCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCAACAATAATGTCTGC ATCTCCAGGGGAGAGGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTATACGTTAC ATATATTGGTACCAACAGAAGCCTGGATCCTCCCCAGACTCCTGATTTATGACAC ATCCAACGTGGCTCCTGGAGTCCCTTTTCGCTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACC TCTTATTCTCTACAATCAACCGAATGGAGGCTGAGGATGCTGCCACTTATTACTG CCAGGAGTGGAGTGGTTATCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAGCT GAAACGT
AM3.26 GenBank AY307933	CAGGTGAAGCTGCAGCAGTAA*GGAAGTGAAGTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTG AAGTTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACATCTTCACAAGTTATGATATAGACTGGGT GAGGCAGACGCCTGAACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTTTCTGGAGAG GGGAGTACTGAATACAATGAGAAGTTCAAGGGCAGGGCCACACTGAGTGTAGACA AGTCTCCAGCACAGCCTATATGGAGCTCACTAGGCTGACATCTGAGGACTCTGCT GTCTATTTCTGTGCTAGAGGGGACTACTATAGGCGCTACTTTGACTTGTGGGGCCA AGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCATGTGGAGGCGGTTCCAGGCGGAGGTGGCTC TGGCGGTGGCGGATCTGACATTGAGCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCA TCTCCAGGGGAGAGGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTATACGTTACA TATATTGGTACCAACAGAAGCCTGGATCCTCCCCAGACTCCTGATTTATGACACA TCCAACGTGGCTCCTGGAGTCCCTTTTCGCTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCT CTTATTCTCTACAATCAACCGAATGGAGGCTGAGGATGCTGCCACTTATTACTGC CAGGAGTGGAGTGGTTATCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAGCTG AAACGT

Tabla 2. Secuencias de nucleótidos de los scFv antipéptido βA_{42} . Los codones de paro están indicados con un asterisco (*) inmediatamente después.

Clona	Secuencia de amino ácidos de los scFv anti péptido βA_{42}
AM2.9	QVKLQESGTEVVKPGASVKLSCKASGYIFTSYDIDWVRQTPEQGLEWIGWIFPGEGST
GenBank	EFNEKFKGRATLSVDKSSSTAYMELTRLTSEDSAVYFWARGDYRRYFDLWGQGTTV
AY307932	TVSSSGGGSGGGGGSGGGSDIELTQSPTIMSASPGERVMTCSASSSIRYIYWYQQK PGSSPRLLIYDTSNVAPGVPPFRFSGSGSGTYSYSLTINRMEAEDAATYYCQEWSGYPY FGGGTKLELKR
AM3.26	QVKLQQWGTEVVKPGASVKLSCKASGYIFTSYDIDWVRQTPEQGLEWIGWIFPGEGS
GenBank	TEYNEKFKGRATLSVDKSSSTAYMELTRLTSEDSAVYFCARGDYRRYFDLWGQGT
AY307933	VTVSSCGGGSGGGGGSGGGSDIELTQSPAIMSASPGERVMTCSASSSIRYIYWYQQ KPGSSPRLLIYDTSNVAPGVPPFRFSGSGSGTYSYSLTINRMEAEDAATYYCQEWSGYPY TFGGGTKLELKR

Tabla 3. Secuencias de amino ácidos de los scFv antipéptido βA_{42} . Los codones de paro se tradujeron como triptófano (W).

Posición	Amino ácido presente en AM2.9	Codón presente en AM2.9	Amino ácido presente en AM3.26	Codón presente en AM3.26	Región del scFv
6	E	GAG	Q	CAG	HFW1
7	S	UCU	W	UAA	HFW1
60	F	UUC	Y	UAC	HCDR2
96	W	UGA	C	UGC	HFW3
143	T	ACA	A	GCA	LFW1

Tabla 4. Diferencias en las secuencias de amino ácidos de las clonas AM2.9 y AM3.26.

Clona	Línea germinal V _H	Línea germinal D _H	Línea germinal J _H	Línea germinal V _k	Línea germinal J _L
AM2.9	IGHV1S24*01 (41)	IGHD-SP2.x*01 (8)	IGHJ2*01 (15)	IGKV4-55*01 (9)	IGKJ5*01 (3)
AM3.26	IGHV1S24*01 (38)	IGHD-SP2.x*01 (8)	IGHJ2*01 (14)	IGKV4-55*01 (24)	IGKJ5*01 (3)

Tabla 5. Alineación de las secuencias de nucleótidos de los scFv con líneas germinales de inmunoglobulinas murinas. Los números entre paréntesis indican las diferencias en nucleótidos en los scFv respecto de la línea germinal.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se seleccionaron anticuerpos scFv anti-péptido βA_{42} a partir de la primera biblioteca inmune anti-péptido βA_{42} construida como parte de este estudio.

A partir del análisis de las secuencias de nucleótidos, se identificaron dos clonas independientes (AM2.9 y AM3.26) con abundantes hipermutaciones, lo que indica que los ratones inmunizados con péptido βA_{42} montaron una respuesta inmune oligoclonal dirigida al antígeno.

Típicamente cuando se usan vectores fagémidos para expresión en pIII en la construcción de bibliotecas inmunes de anticuerpos scFv se obtienen diversidades de 10^4 a 10^7 fagos recombinantes y títulos en los eluidos de cada ronda de bioselección de 10^3 a 10^5 fagos recombinantes (63, 64, 65). La diversidad de la biblioteca construida fue de 10^5 fagos recombinantes y los títulos en los eluidos de cada ronda de bioselección fueron de 10^3 fagos recombinantes, lo que indica una biblioteca pequeña, pero que nos permitió identificar scFv de alta especificidad a su antígeno.

Un hecho importante es que para identificar anticuerpos scFv altamente específicos a un antígeno no es necesario generar una biblioteca muy grande, sino más bien, aprovechar que la hiper-inmunización induce una respuesta inmune oligoclonal, lo que parece suceder en este caso.

Aún falta por determinar si existen más clonas independientes en la biblioteca. Esto podría verificarse mediante la modificación de las condiciones de bioselección y crecimiento bacterial, como sucedió en el caso de la clona AM3.26.

Es bien conocido que muchos anticuerpos scFv son tóxicos para las células *E. coli*, razón más probable por la que no se amplificaron las clonas AM3.10 y

AM3.22. Para solucionar este problema se han diseñado vectores de expresión especiales para subclonar y expresar estos scFv utilizando condiciones óptimas de crecimiento celular (66).

La expresión de secuencias de DNA con codones de paro es un evento que ocurre como parte de los mecanismos normales de regulación de la expresión génica en *E. coli*. Los mecanismos que permiten la expresión de genes con señales de paro son de gran importancia práctica para obtener ligandos de relevancia médica. En las bibliotecas de fagos la expresión de secuencias con codones de paro es parte de la estrategia que utilizan las bacterias para sobrevivir a las secuencias tóxicas de los insertos (67).

Se sabe que un mecanismo de substitución de amino ácidos para los codones de paro UGA y UAA incorpora triptófano (W) a la cadena polipeptídica en algunos vectores de expresión en *E. coli* (68). Por lo que esto es lo más probable que suceda en los codones de paro opalo (UGA) y ocre (UAA) de las clonas AM2.9 y AM3.26

Adicionalmente el uso del hiperfago para amplificar los eluidos de cada ronda de bioselección garantiza que las clonas seleccionadas expresen el DNA del inserto (scFv) debido a que el hiperfago, que sirve como fago ayudador, carece del gIII de M13 en su genoma (69) por lo que todas las partículas virales son recombinantes, lo que fortalece la hipótesis de la incorporación de triptófano (W) en lugar de los codones de paro.

Cuando se usa hiperfago como fago ayudador en lugar de M13KO7 en bibliotecas de scFv, se obtiene un incremento considerable no solo en la cantidad de partículas de fago que llevan el scFv en su superficie, sino que también se incrementa aproximadamente 400 veces la actividad de unión al antígeno debido a la expresión oligovalente de los anticuerpos en cada partícula de fago, lo que permite identificar scFv altamente afines a su antígeno (69).

Los scFv anti-péptido βA_{42} son biomoléculas de gran interés en el desarrollo de nuevos terapéuticos para combatir la EA debido a que pueden actuar extracelularmente pero también intracelularmente como intraanticuerpos.

Los scFv pueden prevenir la formación de agregados del péptido y también disolver los ya existentes, tanto en forma fibrilar como de oligómeros y profibrillas. En forma de intracuerpos pueden unirse a depósitos intra-neuronales de péptido βA (70), por lo que tienen alto potencial terapéutico en el tratamiento de la EA.

El uso de anticuerpos humanos en bibliotecas de fagos como intracuerpos con potencial terapéutico ha sido demostrado anteriormente (71). También se han utilizado scFv como intracuerpos para contrarrestar la agregación proteica en un modelo de la enfermedad de Huntingtong (72).

Una ventaja de los scFv es que no disparan una respuesta inmune celular como la que se genera con la inmunización activa con el péptido βA_{42} , así mismo la remoción de los scFv no activaría células de microglía evitando otra fuente de inflamación. (30, 73)

Se ha demostrado previamente que la administración intranasal de un scFv específico para péptido βA_{42} expresado en un fago alcanzó depósitos del péptido en el cerebro de ratones transgénicos sin efectos tóxicos aparentes (74).

Sin embargo el scFv utilizado en el estudio mencionado fue derivado de una IgM mono-específica para la región lineal EFRH N-terminal (34) y no de una biblioteca inmune como en el presente trabajo. Es importante hacer notar que existen epitopes conformacionales en el péptido βA_{42} y regiones específicas involucradas en la formación de agregados del péptido (31, 23), a los que no se unen los anticuerpos específicos para regiones lineales, pero que podrían identificarse mediante la estrategia utilizada en el presente estudio. Los

anticuerpos dirigidos a estas regiones son muy interesantes en la prevención y tratamiento de la EA.

En un estudio se demostró que la administración pasiva de anticuerpos monoclonales dirigidos a la región central del péptido β A revierte la pérdida de memoria en un modelo murino para la EA (43) y que la administración pasiva de anticuerpos dirigidos contra la región C-terminal del péptido β A reducen los niveles de péptido β A en tejidos cerebrales y protege a las neuronas de daño inducido por crisis epiléptica en un modelo de ratones transgénicos para la EA (75). Sin embargo la administración de anticuerpos completos no es recomendable en pacientes de edad avanzada debido a los posibles procesos inflamatorios que dispara.

Se conoce que formas truncadas en la región N-terminal del péptido β A aumentan los efectos citotóxicos del péptido β A normal y del péptido con la mutación flamenca (A21G), involucrados en la progresión de la EA (76). El ensamblaje del péptido β A en oligómeros involucra la formación de diversas estructuras transitorias que gradualmente se reorganizan en protofibrillas, donde el residuo Ile41 induce la formación de pentámeros / hexámeros, y el residuo Ala42 se requiere para las asociaciones posteriores en superestructuras similares a protofibrillas (77). Por lo que resulta muy importante la selección de scFv dirigidos a diferentes regiones del péptido β A. Aún falta determinar los epítopes en el péptido β A₄₂ que reconocen los scFv seleccionados en este estudio mediante un mapeo usando péptidos sobrelapados de β A₄₂. La biblioteca construida contiene una amplia mezcla de anticuerpos con todas las especificidades posibles inducidas por la inmunización con el péptido β A, sin embargo, se ha encontrado que los anticuerpos dirigidos a la región N-terminal incrementan las microhemorragias asociadas a la angiopatía cerebral amiloide en un modelo de ratones transgénicos para el estudio de la EA (78) por esto es muy importante el mapeo de epítomos para identificar las regiones que reconocen los scFv aislados.

CONCLUSIONES

i) Se construyó la primera biblioteca de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) de anticuerpos murinos anti-péptido βA_{42} expresada en el bacteriófago M13.

ii) Se seleccionaron y caracterizaron scFv de anticuerpos anti-péptido βA_{42} con todas las especificidades posibles contra los epítomos lineales y /o conformacionales presentes en las fibrillas del péptido βA , a partir de la biblioteca construida.

iii) Se encontró que los scFv de anticuerpos anti-péptido βA_{42} son específicos al péptido βA_{42} en ensayos de reconocimiento (ELISA).

PERSPECTIVA

Después de su evaluación *in vitro* y en modelos animales, así como de las modificaciones necesarias con agentes transportadores que incrementen la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica. Los anticuerpos scFv anti-péptido βA expresados en fagos que se seleccionaron en este estudio, y otros que se pueden seleccionar utilizando esta misma estrategia, podrían ser de interés para uso terapéutico mediante inmunización pasiva en pacientes con la enfermedad de Alzheimer.

Otra alternativa sería sintetizar péptidos sintéticos en base de los CDRs de V_H de los scFv anti-péptido βA y usarlos como moléculas afines al péptido con fines terapéuticos.

APÉNDICE 1

“Manoutcharian K., Acero G., Munguia M.E., Montero J.A., Govezensky T., Cao C., Ugen K., Gevorkian G. 20003. *Amyloid-beta peptide-specific single chain Fv antibodies isolated from an immune phage display library*. Journal of Neuroimmunology. Vol 145. pags 12-17.”

Amyloid-beta peptide-specific single chain Fv antibodies isolated from an immune phage display library

K. Manoutcharian^a, G. Acero^a, M.E. Munguia^a, J.A. Montero^a, T. Govezensky^a,
C. Cao^b, K. Ugen^b, G. Gevorkian^{a,*}

^aInstituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, México DF, 04510, México

^bDepartment of Medical Microbiology and Immunology, University of South Florida College of Medicine, Tampa, FL 33612, USA

Received 19 June 2003; received in revised form 27 August 2003; accepted 27 August 2003

Abstract

A single-chain fragment variable (scFv) antibody library displayed on phage was constructed using spleen cells from mice immunized with human amyloid-beta peptide (A β 42). This first anti-A β 42 scFv immune antibody library was selected against human A β 42. A number of positive clones were obtained, and sequences of V_H and V_K genes were analyzed using ExPASy and BLAST computer tools. This analysis revealed that only two unique clones with identical V_H and V_K complementarity determining region (CDR) (except HCDR2) and identical germline genes were selected, indicating that oligoclonal immune response was occurring in A β 42-immunized mice. A β 42-specific scFv antibodies selected from this first immune anti-A β 42 phage antibody library may be an important tool for the development of therapeutic molecules for Alzheimer's disease (AD).

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Phage display; Alzheimer's disease; Single-chain fragment variable (scFv) antibody library

1. Introduction

The accumulation of amyloid-beta peptide (A β) in the brain and its deposition as plaques are hypothesized to play a central and critical role in the neuropathology of Alzheimer's disease (AD). There are previous reports describing the efforts to find compounds that could dissolve or inactivate A β plaques or prevent the aggregation of the peptide. Among these compounds are anti-A β antibodies that were shown to bind to preformed fibrils and lead to their disaggregation and inhibition of their neurotoxic effects (Solomon et al., 1997).

Also, *in vivo* studies have shown that immunization of transgenic mice overexpressing human amyloid precursor protein (APP) with A β 42 can prevent or alleviate AD-like neuropathological features along with a significant decrease in the cerebral A β plaque burden (Schenk et al., 1999; Janus

et al., 2000; Morgan et al., 2000). These studies suggest the use of A β immunization as a therapeutic approach that may prevent and, possibly, treat AD. Human clinical trials with A β 42 were started, but some patients developed symptoms of brain inflammation, and this phase 2A clinical trial was halted (Munch and Robinson, 2002). Some recent evidence, however, indicates that irrespective of the adverse events, the patients who developed significant antibody titers against A β 42 did not demonstrate cognitive decline (Hock et al., 2003). These data indicate that the vaccine strategy against A β 42 has potential.

One of the potential disadvantages of any active immunization procedure is the generation of a robust immune responses, including cellular immunity, which may not be necessarily desirable in an elderly patient population suffering from AD. The idea that passive immunotherapy would be more appropriate for these individuals promoted the efforts toward generation of antibodies capable of preventing and clearing amyloid aggregates. Bard et al. showed that peripherally administered polyclonal and monoclonal antibodies against A β entered the central nervous system and reduced plaque burden by 93% and

* Corresponding author. Tel.: +52-5556223151; fax: +52-5556223369.
E-mail address: gokar@servidor.unam.mx (G. Gevorkian).

81%, respectively, along with reduction of pathology in a mouse model of AD (Bard et al., 2000). These results indicate that in the absence of T-cell immunity, antibodies are sufficient to decrease amyloid deposition and AD-like pathology. Recently, Bacskai et al. reported that FITC-labeled F(ab)₂ fragment of a monoclonal anti-A β antibody 3D6 led to the clearance of 45% of the amyloid deposits in 18-month-old transgenic mice within 3 days, similar to the results obtained with full-length 3d6 antibody (Bacskai et al., 2002). These results suggest that direct disruption of fibrils, in addition to classical Fc-dependent phagocytosis, is involved in the antibody-mediated clearance of A β aggregates in vivo. Two years earlier, Frenkel et al. showed that direct biophysical interaction of antibody fragments with amyloid aggregates in vitro may lead to their disruption (Frenkel et al., 2000). A single-chain fragment variable (scFv) antibody constructed from variable regions of heavy and light chain genes of the parental anti-A β IgM monoclonal antibody exhibited anti-aggregating properties, leading to disaggregation of amyloid fibrils and prevented its toxic effect on cultured PC-12 cells. These authors also introduced mutations into the original sequence of scFv and selected A β binding scFv antibodies with improved anti-aggregating properties compared with parental antibody. It is important to note that in this study, authors evaluated the one antibody specificity since their source for antibody variable-region sequences was the one IgM hybridoma.

In the present study, we constructed the first immune anti-A β phage-displayed murine scFv antibody library and selected by biopanning a number of new A β -specific scFv antibodies.

2. Materials and methods

2.1. Construction of anti-A β scFv antibody phage display library

Spleen cells from mice immunized with A β 42 were used as a source of immunoglobulin genes. Three 6-week-old BALB/c mice were immunized with A β 42 (BACHEM Bioscience, King of Prussia, PA, USA): A β 42 was first suspended in pyrogen-free type 1 water at 2 mg/ml, then mixed with 10 \times PBS to yield 1 \times PBS and incubated overnight at 37 $^{\circ}$ C. This immunogen preparation was mixed with Freund's complete adjuvant for priming of mice, and with incomplete Freund's adjuvant for boost injections. Four immunizations were performed at 14-day interval. One week after the fourth immunization, mouse sera were tested in ELISA for the presence of specific anti-A β 42 antibodies. Briefly, a 96-well plate (Nunc, Roskilde, Denmark) was coated with 1 μ g/ml of A β 42 in phosphate buffer (pH 7.8) overnight at 4 $^{\circ}$ C. The plate was washed with phosphate buffer containing 0.1% Tween-20 (PBS-Tween) and blocked with PBS containing 2% bovine serum albumin (PBS-BSA). After washing, mouse sera diluted in PBS-

BSA 1% was added, and the plate was incubated for 1 h at 37 $^{\circ}$ C. The plate was washed and goat anti-mouse IgG conjugated with HRP (Zymed, San Francisco, CA, USA) was added. After incubation for 1 h at 37 $^{\circ}$ C, the plate was washed and 2,2'-azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) single solution (Zymed) was added. The OD reading at 405 was registered using Opsys MR Microplate Reader (DYNEX Technologies, Chantilly, VA, USA).

The mRNA was extracted from the splenocytes of immunized mice using QuickPrep mRNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech, USA) as recommended by the manufacturer. First, strand cDNA was synthesized from mRNA using random pd(N)₆ primer according to RPAS Mouse ScFv Module (Amersham Pharmacia Biotech) manufacturer's instructions. Then Ig heavy (V_H) and light (V_K) genes were amplified from cDNA using specific primers provided in the same kit. PCR products were gel purified using a Concert Rapid Gel Extraction System (Amersham Pharmacia Biotech) and used in assembly reaction to join V_H and V_K DNA into a single chain (V_H-V_K) with linker DNA. This DNA was used as a template for PCR re-amplification with flanking oligonucleotides containing appended restriction sites *Sfi*I and *Not*I. The DNA of scFv gene repertoires were gel purified, digested with *Sfi*I and *Not*I and ligated into the similarly digested vector pCANTAB-5E DNA (Amersham Pharmacia Biotech). After extraction with phenol/chloroform and ethanol precipitation, the ligation mix was electroporated into 50 μ l *Escherichia coli* TG1 cells using Gene Pulser II System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Ten electroporations were performed, and the resultant phagemid library was rescued/amplified using M13K07 helper phage (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and the Expression Module/Recombinant Phage Antibody System (Amersham Pharmacia Biotech). The transformed TG1 cells were plated on LB-Amp plates. The diversity of the library was 2.2 \times 10⁵ individual recombinants. The typical phage yields were 10¹⁰–10¹¹ colony-forming units (cfu) per milliliter of culture medium.

2.2. Selection of A β -specific scFv antibodies by biopanning against A β

Selection and amplification procedures for the scFv library was carried out essentially as described for peptide libraries in our previous studies (Gevorkian et al., 1998; Manoutcharian et al., 1999; Gevorkian et al., 2000), using 96-well plates (Nunc) coated overnight with 2 μ g/ml of A β 42 in PBS. Plates were blocked with PBS/BSA 2%, and then phages were added at a concentration of 10¹³/ml. After incubation for 4 h at 4 $^{\circ}$ C, plates were washed with cold PBS-Tween, and bound phage was eluted using 100 μ l/well of 100 mM Triethylamine. Tris-HCl (1 M) was added to neutralize the eluate. In each round, we rescued phagemid library using helper phage M13K07. Three rounds of biopanning were performed.

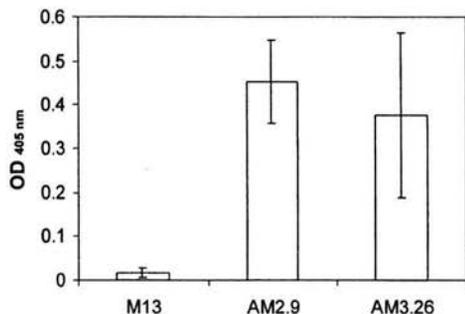


Fig. 1. ELISA binding of Aβ42 with selected scFv antibody bearing phage. Phage clones were added to the Aβ42-coated wells. Bound phage was detected using HRP-conjugated anti-M13 monoclonal antibody. Wild-type phage was used as a negative control. Mouse anti-Aβ42 serum was used as a positive control and showed OD₄₀₅ = 2.29 ± 0.022.

2.3. ELISA screening of selected scFv antibodies expressed on phage

After each round of selection, single ampicillin-resistant colonies were used to inoculate 96-well cell culture plates (Costar, Corning, NY, USA) containing 125 μl of 2-YT-Amp-glucose. Plates were incubated for 4 h at 37 °C, 100 μl of 2xYT containing hyperphage (Rondot et al., 2001; kindly provided by Dr. B.Becerril) was added to each well. After 30 min of incubation without shaking and 30 min of incubation with shaking, plates were centrifuged and supernatants were removed. Fresh 2xYT without glucose but supplemented with ampicillin and kanamycin was added to each well, and plates were incubated overnight at 30 °C with shaking. Microtiter plates (Nunc) were coated with Aβ and blocked as described above, supernatants from plates containing phage were added, and after incubation for 1 h at 37 °C, plates were washed with PBS–Tween. HRP/Anti-M13 monoclonal conjugate (Amersham Pharmacia Biotech) diluted in PBS–BSA 1% was added, and plates were incubated for 1 h at 37 °C. Plates were washed and ABTS single solution (Zymed) was added. The OD reading at 405 was registered using Opsy MR Microplate Reader (DYNEX Technologies). The reported data are representative of three different experiments.

2.4. DNA sequencing

The DNA sequences of the inserts of selected scFv-expressing phagemid clones were determined using automated ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), miniprep-purified (Qiagen) double-stranded DNA of the clones and pCANTAB 5 Sequencing Primer Set (Amersham Pharmacia Biotech). The DNA and deduced amino acid sequences were analyzed by computer search with ExPASy Molecular Biology server

(<http://www.expasy.ch/tools/>), BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>) and IMGT (the International ImmunoGeneTics Information System: <http://imgt.cines.fr>) database. The DNA and amino acid sequences of isolated scFvs were submitted to GenBank database.

3. Results

3.1. Construction of anti-Aβ scFv antibody phage display library

Preparation of scFv antibody phage display libraries involves four stages: (1) isolation of mRNA from a source of antibody-producing cells; (2) preparation of the scFv repertoires; (3) cloning of the scFv repertoires into a phagemid vector; and (4) expression of the scFv in the surface of phage.

Spleen cells from mice immunized with Aβ were used to generate a scFv phage antibody library. The V_H and V_K genes were amplified from mRNA, spliced together and the obtained scFv gene repertoires were cloned into pCANTAB-5E to generate a phage displayed scFv antibody library of 2.2 × 10⁵ transformants. PCR analysis of 16 randomly selected clones showed that the majority carried full length inserts (data not shown).

3.2. Selection of Aβ-specific scFv antibodies by biopanning against Aβ and ELISA screening of selected scFvs

In order to identify Aβ42-specific scFv antibodies, the constructed immune library was rescued using M13K07 helper phage and selected against human Aβ42. Three rounds of biopanning were performed, and 180 individual clones were randomly picked, rescued using hyperphage and screened for their capacity to bind to Aβ42 in ELISA. Wild-type phage was used as negative control to discard non-specific interactions between phage and Aβ42. OD readings of binding of positive clones to Aβ42 are shown on Fig. 1. PCR analysis showed that all positive clones carried full-length DNA inserts (Fig. 2).

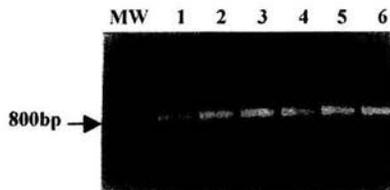


Fig. 2. PCR analysis of DNA isolated from six positive phage clones (lane 1–6). DNA were PCR amplified and separated on a 1% agarose gel, and bands were visualized by ethidium bromide staining and UV illumination.

Table 1
Germline genes/segments and CDR3 sequences of scFv antibodies isolated from immune library selected on β -amyloid peptide*

Clone	V _H germline	D _H germline	J _H germline	HCDR3	V _K germline	J _L germline	LCDR3
AM2.9	IGHV1S24*01 (41) ^b	IGHD-SP2.x*01 (8) ^b	IGHJ2*01 (15) ^b	GDYYRRYFDL (4) ^c	IGKV4-55*01 (9) ^b	IGKJ5*01 (3) ^b	QEWSGYPYT (3) ^c
AM3.26	IGHV1S24*01 (38) ^b	IGHD-SP2.x*01 (8) ^b	IGHJ2*01 (14) ^b	GDYYRRYFDL (4) ^c	IGKV4-55*01 (24) ^b	IGKJ5*01 (3) ^b	QEWSGYPYT (3) ^c

* Mouse germline V_H, V_K, D_H, J_H and J_L segments have been assigned as detailed in the International ImMunoGeneTics Information System (IMGT). These two clones with identical V_H and V_L CDR3 regions showed different HCDR2 and framework regions, as indicated by their differences from the germline genes (accession can be made through GenBank with numbers AY307932 and AY307933). Among eight clones analyzed in total, AM2.9 was isolated seven times and AM3.26 only one time, respectively.

^b Differences in nucleotides from V_H and V_K germline sequences.

^c Differences in amino acid sequences of V_H and V_L CDR3 regions of selected scFv from germline-determined regions.

3.3. Sequence analysis of V_H and V_K genes of selected scFvs

Eight phage clones with the highest OD values in ELISA were further analyzed by determining the nucleotide sequences encoding their V_H and V_K genes. The amino acid sequences of these clones were deduced from their nucleotide sequences. The obtained sequences were analyzed using Expasy and BLAST computer tools and aligned to the most homologous germline gene sequences in the IMGT/DNA PLOT directory (Table 1). As shown in Table 1, only two unique clones with identical V_H and V_K complementarity determining regions (CDR) (except HCDR2) and identical germline genes/segments were found. The clone AM 2.9, isolated seven times, and AM 3.26, isolated one time, have eight nucleotide (nt) and four amino acid (aa) differences in framework region 1 (FR1), HCDR2 and FR3 of V_H and four nt and one aa in FR1 of V_K chain (not shown). Extensive differences at both nt and aa level from germline sequences were found in isolated clones including four and three aa changes in CDR3 regions of both heavy and light chains (Table 1). Interestingly, a single UAA and UGA stop codons were present in V_H FR1 and in FR3 regions of AM 2.9 and AM 3.26 clones, respectively. Most probably, these stop codons are translated on ribosomes through incorporation of tryptophan (W) into the polypeptide chain.

4. Discussion

We have selected a number of anti-A β 42 scFv antibodies using the first immune anti-A β 42 scFv antibody library constructed in our laboratory. The analysis of nucleotide sequences of eight isolated scFv clones resulted in identification of only two unique clones with extensive hypermutations, particularly in CDR regions, indicating that antigen-driven immune response was occurring in A β -immunized mice. We believe that there is no need to generate very large immune scFv antibody libraries to isolate antigen-specific scFv clones, since generally, hyperimmunization induces oligoclonal immune responses, as what probably took place in our case. However, it remains

to be seen whether other unique clones are present in our library by modifying biopanning and/or bacterial cell growing conditions and selecting more clones. In this regard, it is well known that many scFvs are toxic to *E. coli* cells, therefore, special expression vectors containing inducible promoter regions were designed to express scFvs creating optimal cell growing conditions (Tessmann et al., 2002). Hence, the isolation of our two clones containing UGA (opal) and UAA (ochre) stop codons is the result of scFv-pIII M13 fusion protein expression at low level in bacterial cells allowing their survival. The expression of DNA sequences with these stop codons is not a rare event and, along with the frameshift and ribosome slippage is the part of general mechanism of the regulation of protein expression in *E. coli* (Carcamo et al., 1998). It was shown that tryptophan (W) is inserted at the UGA stop codon (MacBeath and Kast, 1998) and that UGA- and UAA-containing DNA inserts are efficiently expressed in *E. coli*, which were cloned in phagemid vector pCANTAB 5E, also used in our study (Carcamo et al., 1998). Other evidence that our clones are expressing scFv-pIII fusion protein on M13 phage surface is the application of hyperphage as helper phage, which lacks the M13 gIII in phage genome. So, most probably, tryptophan (W) is expressed in our scFv phage clones at the positions of these stop codons in V_H FR1 and FR3 regions.

For AD, anti-A β scFv antibodies are of great interest and may act both extracellularly and intracellularly (intrabodies). These scFvs can prevent the formation of A β aggregates, can dissolve the existing fibrils, pro-fibrils or oligomers as well as, in the case of intrabodies, may bind to intraneuronal deposits of A β 42. It is important to note that recent studies demonstrated early intraneuronal accumulation and immunoreactivity of A β 42 and the presence of stable dimers of A β 42 in neural cells in culture, before their release into the medium (Selkoe, 2001; Gouras et al., 2000). These observations emphasize the potential therapeutic effect of internalizing antibodies for prevention of intraneuronal A β 42 aggregation for the treatment of AD. The therapeutic potential of intrabodies was demonstrated previously for tumor-specific antibodies (Poul et al., 2000) as well as in studies on Huntington disease (Lecerf et al., 2001).

As for any passive immunization protocol, one of the advantages of scFv antibodies is the absence of unwanted and deleterious cellular immune response caused by A β 42 immunization. In addition, since the clearance of A β 42–scFv complex in vivo would not activate microglia as in the case of full-length antibody, this additional source of inflammation in patients (Lue and Walker, 2002) would be avoided.

It has been demonstrated previously that intranasal administration of a A β 42-specific scFv antibody displayed on phage targeted A β deposition in the brain of live transgenic mice (Frenkel and Solomon, 2002). No visible toxic effects after phage administration were detected in the brain by histology studies.

In previous studies (Frenkel et al., 2000; Frenkel and Solomon, 2002), scFv antibodies with a single specificity of a parental IgM that recognized N-terminal linear EFRH region of A β 42 were evaluated. However, there are reports on the existence of a conformational epitopes on A β 42 as well as other regions on this molecule involved in fibril formation (Gaskin et al., 1993; Pike et al., 1995; Ma and Nussinov, 2002), and antibodies directed to these regions could be of interest for AD treatment and prevention. Thus, it has been shown that passive administration of monoclonal antibodies directed to the central region of A β reverses memory deficits in mice (Dodart et al., 2002) and administration of antibodies directed to C termini of A β significantly reduced the number of seizure-induced degenerating cells in the hippocampus (Mohajeri et al., 2002). Also, the higher toxicity of N-truncated amyloid peptides A β (12–42) compared with the full-length peptide was demonstrated (Demcester et al., 2001). Moreover, combining of biochemical, spectroscopic and morphologic methods in the recent study by Bitan et al. (Bitan et al., 2003) allowed the further elucidation of the role of A β 42 Ile-41 residue in promoting the initial oligomerization of A β 42 and that of Ala-42 residue in facilitating the peptide's self-association. The major advantage of our approach is the possibility of selection of scFv antibodies directed to different regions of A β since our anti-A β scFv library contains a large pool of antibodies with all possible specificities induced by A β immunization in contrast to a library based on immunoglobulin gene of a single IgM antibody directed to amino-terminal region of A β (Frenkel et al., 2000). Moreover, it has been demonstrated that these anti-amino-terminal antibodies resulted in an increase in cerebral amyloid angiopathy (CAA)-associated microhemorrhages in APP23 transgenic mice (Pfeifer et al., 2002). Identification of antibodies recognizing other linear or conformational epitopes on A β 42 may help to prevent possible side effects. Our ongoing studies on epitope mapping will give the answer about the nature of epitope recognized by isolated scFv.

In conclusion, considering all existing data pointing to a possibility that anti-A β antibodies could interfere with AD, we think that phage-displayed anti-A β 42 scFv antibodies selected in this study could be of interest for therapeutic use

for passive immunization of AD patients after evaluation in vitro, modification with substances that increase their blood–brain barrier permeability and conduction of all necessary studies in animal models.

Acknowledgements

The authors thank P. De la Torre for DNA sequencing. This work was supported in part by grant from the NIH (AG20227) to KU.

References

- Bacskai, B.J., Kajdasz, S.T., McLellan, M.E., Games, D., Seubert, P., Schenk, D., Hyman, B.T., 2002. Non-Fc-mediated mechanisms are involved in clearance of amyloid- β in vivo by immunotherapy. *J. Neurosci.* 22, 7873–7878.
- 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, K., Seubert, P., Schenk, D., Yednock, T., 2000. Peripherally administered antibodies against amyloid- β peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 6, 916–919.
- Bitan, G., Kirkitadze, M.D., Lomakin, A., Vollers, S.S., Benedek, G.B., Teplow, D.B., 2003. Amyloid β -protein (A β) assembly: A β 40 and A β 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 330–335.
- Carcamo, J., Ravera, M.W., Brissette, R., Dedova, O., Beasley, J.R., Alam-Moghr, A., Wan, C., Blume, A., Mandecki, W., 1998. Unexpected frameshifts from gene to expressed protein in a phage-displayed peptide library. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 11146–11151.
- Demeester, N., Mertens, C., Caster, H., Goethals, M., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M., Labeur, C., 2001. Comparison of the aggregation properties, secondary structure and apoptotic effects of wild-type, Flemish and Dutch N-terminally truncated amyloid β peptides. *Eur. J. Neurosci.* 13, 2015–2024.
- Dodart, J.C., Bales, K.R., Gannon, K.S., Greene, S.J., DeMattos, R.B., Mathis, C., DeLong, C.A., Wu, S., Wu, X., Holtzman, D.M., Paul, S.M., 2002. Immunization reverses memory deficits reducing A β burden in Alzheimer's disease model. *Nat. Neurosci.* 5, 452–457.
- Frenkel, D., Solomon, B., 2002. Filamentous phage as vector-mediated antibody delivery to the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 5675–5679.
- Frenkel, D., Solomon, B., Benhar, I., 2000. Modulation of Alzheimer's β -amyloid neurotoxicity by site-directed single-chain antibody. *J. Neuroimmunol.* 106, 23–31.
- Gaskin, F., Finley, J., Fang, Q., Xu, S., Fu, S.M., 1993. Human antibodies reactive with β -amyloid protein in Alzheimer's disease. *J. Exp. Med.* 177, 1181–1186.
- Gevorkian, G., Manoutcharian, K., Almagro, J.C., Govezensky, T., Dominguez, V., 1998. Identification of autoimmune thrombocytopenic purpura-related epitopes using phage-display peptide library. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 86, 305–309.
- Gevorkian, G., Manoutcharian, K., Govezensky, T., Cano, A., Dominguez, V., Santamaria, H., Larralde, C., 2000. Identification of mimotopes of platelet autoantigens associated with autoimmune thrombocytopenic purpura. *J. Autoimmun.* 15, 33–40.
- Gouras, G.K., Tsai, J., Naslund, J., Vincent, B., Edgar, M., Checler, F., Greenfield, J.P., Haroutunian, V., Buxbaum, J.D., Xu, H., Grenngard, P., Relkin, N.R., 2000. Intraneuronal A β 42 accumulation in human brain. *Am. J. Pathol.* 156, 15–20.

- Hock, C., Konietzko, U., Streffer, J.R., Tracy, J., Signorell, A., Muller-Tillmanns, B., Lemke, U., Henke, K., Moritz, E., Garcia, E., Wollmer, M.A., Umbrecht, D., de Quervain, D.J.F., Hofmann, M., Maddalena, A., Papassotiropoulos, A., Nitsch, R.M., 2003. Antibodies against β -amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron* 38, 1–20.
- Janus, C., Pearson, J., McLaurin, J., Mathews, P.M., Jiang, Y., Schmidt, S.D., Azhar Chishti, M., Horne, P., Heslin, D., French, J., Mount, H.T.J., Nixon, R.A., Mercken, M., Bergeron, C., Fraser, P.E., St. George-Hyslop, P., Westaway, D., 2000. $A\beta$ peptide immunization reduces behavioral impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 408, 979–982.
- Lecerf, J.-M., Shirley, T.L., Zhu, Q., Kazantsev, A., Amersdorfer, P., Housman, D.E., Meeker, A., Huston, J.S., 2001. Human single-chain Fv intrabodies counteract in situ huntingtin aggregation in cellular models of Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 4764–4769.
- Lue, L.F., Walker, D.G., 2002. Modeling Alzheimer's disease immune therapy mechanisms: interactions of human postmortem microglia with antibody-opsonized amyloid- β peptide. *J. Neurosci. Res.* 70, 599–610.
- Ma, B., Nussinov, R., 2002. Stabilities and conformations of Alzheimer's β -amyloid peptide oligomers ($A\beta$ 16–22, $A\beta$ 16–35, and $A\beta$ 10–35): sequence effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 14126–14131.
- MacBeath, G., Kast, P., 1998. UGA read-through artifacts—when popular gene expression systems need a pATC. *BioTechniques* 24, 789–794.
- Manoutcharian, K., Sotelo, J., Garcia, E., Cano, A., Gevorkian, G., 1999. Characterization of cerebrospinal fluid antibody specificities in neurocysticercosis using phage display peptide library. *Clin. Immunol.* 91, 117–121.
- Mohajeri, M.H., Sainin, K., Schultz, J.G., Wollmer, M.A., Hock, C., Nitsch, R.M., 2002. Passive immunization against β -amyloid peptide protects central nervous system (CNS) neurons from increased vulnerability associated with an Alzheimer's disease-causing mutation. *J. Biol. Chem.* 277, 33012–33017.
- Morgan, D., Diamond, D.M., Gottschall, P.E., Ugen, K., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D., Connor, K., Hatcher, J., Hope, C., Gordon, M., Arendash, G.W., 2000. $A\beta$ peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408, 982–985.
- Munch, G., Robinson, R., 2002. Potential neurotoxic inflammatory responses to $A\beta$ vaccination in humans. *J. Neural Transm.* 109, 1081–1087.
- Pfeifer, M., Boncristiano, S., Bondolfi, L., Stalder, A., S eller, T., Staufenbiel, M., Mathews, P.M., Jucker, M., 2002. Cerebral hemorrhage after passive anti- $A\beta$ immunotherapy. *Science* 298, 1379.
- Pike, C.J., Overman, M.J., Cotman, C.W., 1995. Amino-terminal deletions enhance aggregation of β -amyloid peptides in vitro. *J. Biol. Chem.* 270, 23895–23898.
- Poul, M.-A., Becerril, B., Nielsen, U.B., Morisson, P., Marks, J.D., 2000. Selection of tumor-specific internalizing human antibodies from phage libraries. *J. Mol. Biol.* 301, 1149–1161.
- Rondot, S., Koch, J., Breiting, F., Dubel, S., 2001. A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nat. Biotechnol.* 19, 75–78.
- 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., Vandeventer, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D., Seubert, P., 1999. Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400, 173–177.
- Selkoe, D.J., 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Phys. Rev.* 81, 741–766.
- Solomon, B., Koppel, R., Frankel, D., Hanan-Aharon, E., 1997. Disaggregation of Alzheimer β -amyloid by site-directed mAb. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 4109–4112.
- Tessmann, K., Erhardt, A., Haussinger, D., Heintges, T., 2002. Cloning and molecular characterization of human high affinity antibody fragments against Hepatitis C virus NS3 helicase. *J. Virol. Methods* 103, 75–88.

REFERENCIAS

- 1.- Nussbaum R., Ellis C. 2003. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Eng J Med.* 348. 1356-64.
- 2.- Dugué M., Neugroschl J., Sewell M., Marin D. 2003. Review of dementia. *The mount sinai journal of medicine.* 70. 45-53.
- 3.- Winblad B., Blum K. 2003. Hints of a therapeutic vaccine for Alzheimer's? *Neuron.* 38. 517-19.
- 4.- Wolfe M. 2002. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Nature Drug Discovery.* 1. 859-66.
- 5.- Thompson L. 2003. Unraveling the secrets of Alzheimer's β -amyloid fibrils. *PNAS.* 100. 383-85.
- 6.- Citron M. 2002. Alzheimer's disease: Treatments in discovery and development. *Nature Neuroscience supplement.* 5. 1055-57.
- 7.- Shastry B. 2003. Neurodegenerative disorders of protein aggregation. *Neurochemistry International.* 43. 1-7.
- 8.- Hardy J., Selkoe D. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 297. 353-56.
- 9.- Tanzi R., Bertram L. 2001. New frontiers in Alzheimer's disease genetics. *Neuron.* 32. 181-84.
- 10.- Irizarry M., Hyman B. 2001. Alzheimer disease therapeutics. *J of Neuropath and Exp Neurol.* 60. 923-28.

- 11.- Roth K. 2001. Caspases, apoptosis and Alzheimer disease: causation, correlation and confusion. *J of Neuropath and Exp Neurol.* 9. 829-38.
- 12.- Small D., Mok S. S., Bornstein J. 2001. Alzheimer's disease and A β toxicity: from top to bottom. *Nature Reviews.* 2. 595-98.
- 13.- Fassbender K., Masters C., Beyreuther K. 2001. Alzheimer's disease: molecular concepts and therapeutic targets. *Naturwissenschaften.* 88. 261-67.
- 14.- Klein W., Kraft G., Finch C. 2001. Targeting small A β oligómeros: the solution to an Alzheimer's disease conundrum?. *Trends in Neurosci.* 24.219-24.
- 15.- Maimone D., Dominici R., Grimaldi L. 2001. Pharmacogenomics of neurodegenerative diseases. *Eur J of Pharmacol.* 413. 11-29.
- 16.- Vickers J., Dickson T., Adlard P., Saunders H., King C., McCormack G. 2000. The cause of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.* 60. 139-65.
- 17.- Kaye R., Head E., Thompson J., McIntire T., Milton S., Cotman C., Glabe C. 2003. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science.* 300. 486-89.
- 18.- Murakami K., Irie K., Morimoto A., Ohigashi H., Shindo M., Nagao M., Shimizu T., Shirasawa T. 2002. Synthesis, aggregation, neurotoxicity, and secondary structure of various A β 1-42 mutants of familial Alzheimer's disease at positions 21-23. *Biochem Biophys Res Comm.* 294. 5-10.
- 19.- Wengenack T., Curran G., Poduslo J. 2000. Targeting Alzheimer amyloid plaques in vivo. *Nature Biotech.* 18. 868-72.

20.- Skovronsky D., Zhang B., Kung H., Trojanowski J., Lee V. 2000. In vivo detection of amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. PNAS. 97. 7609-14.

21.- Serpell L., Sunde M., Benson M., Tennent G., Pepys M., Fraser P. 2000. The protofilament substructure of amyloid fibrils. J. Mol. Biol. 300. 1033-39.

22.- Jackson T., Yang D., Plaskos N., Go S., Yip C., Fraser P., Chakrabartty A. 2000. Structural studies of soluble oligomers of the Alzheimer β -amyloid peptide. J. Mol. Biol. 297. 73-87.

23.- El-Agnaf O., Mahil D., Patel B., Austen B. 2000. Oligomerization and toxicity of β -amyloid-42 implicated in Alzheimer's disease. Biochem. Biophys. Res. Com. 273. 1003-1007.

24.- Shoji M., Golde T., Ghiso J., Cheung T., Estus S., Shaffer L., Cai X., McKay D., Tintner R., Frangione B., Younkin S. 1992. Production of the Alzheimer amyloid β protein by normal proteolytic processing. Science. 258. 126-29.

25.- Golde T., Eckman C., Younkin S. 2000. Biochemical detection of A β isoforms: implications for pathogenesis, diagnosis, and treatment of Alzheimer's disease. Biochimica et Biophysica acta. 1502. 172-87.

26.- Urbanc B., Cruz L., Le R., Sanders J., Hsiao K., Duff K., Stanley E., Irizarry M., Hyman B. 2002. Neurotoxic effects of thioflavin S-positive amyloid β deposits in transgenic mice and Alzheimer's disease. PNAS. 99. 13990-95.

27.- Lorenzo A., Yuan M., Zhang Z., Paganetti P., Sturchler-Pierrat C., Staufenbiel M., Mautino J., Sol F., Sommer B., Yankner B. 2000. Amyloid β

interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*. 5. 460-64.

28.- McGeer P., McGeer E. 2003. Is there a future for vaccination as a treatment for Alzheimer's disease? *Neurobiology of aging*. 24. 391-95.

29.- Robinson S., Bishop G., Münch G. 2003. Alzheimer vaccine: amyloid- β on trial. *BioEssays*. 25. 283-88.

30.- Washington E. 2002. Nerve inflammation halts trial for Alzheimer's drug. *Nature*. 415. 462.

31.- Gaskin F., Finley J., Fang Q., Xu S., Man S. 1993. Human antibodies Reactive with β -amyloid protein in Alzheimer's disease. *J. Exp. Med.* (177) pags. 1181-86.

32.- Solomon B., Koppel R., Hanan E., Katzav T. 1996. Monoclonal antibodies inhibit in vitro fibrillar aggregation of Alzheimer β -amyloid peptide. *P.N.A.S.* (93) pags. 452-455.

33.- Solomon B., Koppel R., Frankel D., Hanan-Aharon E. 1997. Disaggregation of Alzheimer β -amyloid by site-directed mAb. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (94) pags. 4109-12.

34.- Frenkel D., Balass M., Solomon B. 1998. N-terminal EFRH sequence of Alzheimer's β -amyloid peptide represents the epitope of its anti-aggregating antibodies. *J. Neuroimmunol.*

35.- 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., Zhenmei L., Lieberburg I., Motter R., Mutter L., Soriano F., Shopp G., Vesquez N., Vandeventer c.,

Walker S., Wogulis M., Yednock T., Games D., Seubert P. 1999. Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*. (400) pags 173-77.

36.- 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., Wiss K., Welch B., Seubert P., Schenk D., Yednock T. 2000. Peripherally administered antibodies against amyloid β - peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nature Medicine* (6) pags 916-19.

38.- Morgan D., Diamond D., Gottschall P., Ugen K., Dickey C., Hardy J., Duff K., Jantzen P., DiCarlo G., Wilcock D., Connor K., Hatcher J., Hope C., Gordon M., Arendash G. 2000. A β peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* (408) pags 982-985.

39.- Janus C., Pearson J., McLaurin J., Mathews P., Jiang Y., Schmidt S., Chishti M., Horn P., Heslin D., French J., Mount H., Nixon R., Mercken M., Bergeron C., Fraser P., St George-Hyslop P., Westaway D. 2000. A β peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* (408) pags 979-982.

41.- Lee V. 2001. AB immunization: moving A β peptide from brain to blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (98) pags 8931-8932.

43.- Dodart J.C., Bales K., Gannon K., Greene S., DeMattos R., Mathis C., DeLong C., Wu S., Wu X., Holtzman D., Paul S. 2002. Immunization reverses memory deficits without reducing brain A β burden in Alzheimer's disease model.

44.- Tammer A., Coia G., Cappai R., Fuller S., Masters C., Hudson P., Underwood J. 2002. Generation of a recombinant Fab antibody reactive with the Alzheimer's disease-related A β peptide. Clin. Exp. Immunol. (129) pags 453-463.

46.- McLaurin J., Cecal R., Kierstead M., Tian X., Phinney A., Manea M., French J., Lambermon M., Darabie A., Brown M., Janus C., Chrishti M., Horne P., Westaway D., Fraser P., Mount H., Przybylski M., St George-Hyslop P. 2002. Therapeutically effective antibodies against amyloid- β peptide target amyloid-B residues 4-10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis. Nat. Med. (8) pags 1263-1269.

47.- Hock C., Konietzko W., Papassotiropoulos A., Wollmer A., Streffer J., Von Rotz R., Davey G., Moritz E., Nitsch R. 2002. Generation of antibodies specific for β -amyloid by vaccination of patients with Alzheimer's disease. Nat. Med. (8) pags 1270-1275.

48.- Hock C., Konietzko W., Streffer J., Tracy J., Signorell A., Müller-Tillmanns B., Lemke U., Henke K., Moritz E., Garcia E., Wollmer A., Umbricht D., de Quervain D., Hofmann M., Maddalena A., Papassotiropoulos A., Nitsch R. 2003. Antibodies against β -amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. Neuron. (38) pags 547-54.

49.- Petrenko V., Vitaly J. 2003. Phage Display for detection of biological threat agents. J of Microbiol Meth. (53) pags. 253 - 262.

50.- Kretzschmar T. Von Ruden T. 2002. Antibody discovery: phage display. Curr. Opi. Biotech. (13) pags. 598-602.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

51.- Manoutcharian K., Gevorkian G., Cano A., Almagro J. 2001. Phage displayed biomolecules as preventive and therapeutic agents. *Curr. Pharma. Biotech.* (2) pags. 217-223.

52.- Sidhu S. 2001. Engineering M13 for phage display. *Biomolecular Engineering.* (18) pags. 57-63.

53.- Ladner R. 2000. Phage display and pharmacogenomics. *Pharmacogenomics.* (2) pags. 199-202.

54.- Schmitz U., Versmold A., Kaufmann P., Frank H.-G. 2000. Phage display: a molecular tool for the generation of antibodies. *Placenta.* (21) pags. S106-S112.

55.- FitzGerald K. 2000. In vitro display technologies – new tools for drug discovery. *Drug Discovery Today.* (5) pags. 253-258.

56.- Hoogenboom H., Chames P. 2000. Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunology today.* (21) pags. 371-378.

57.- Sidhu S. 2000. Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology.* (11) pags. 610-616.

58.- Kristensen P., Ravn P., Jensen KB., Jensen K. 2000. Applying phage display technology in aging research. *Biogerontology.* (1) pags. 67-78.

59.- O'Connell D., Becerril B., Roy-Burman A., Daws M. and Marks J.D. 2002. "Phage versus phagemid libraries for generation of Human monoclonal antibodies". *J Mol Biol.* (231) pags 49-56.

60.- Gevorkian G., Manoutcharian K., Almagro J., Govezensky T., Dominguez V., 1998. Identification of autoimmune thrombocytopenic purpura-

related epitopes using phage-display peptide library. *Clin. Immunol. Immunopathol.* (86) pags 305-309.

61.- Gevorkian G., Manoutcharian K., Govezensky T., Cano A., Dominguez V., Santamaria H., Larralde C. 2000. Identification of mimotopes of platelet autoantigens associated with autoimmune thrombocytopenic purpura. *J Autoimmun.* (15) pags. 33-40.

62.- Manoutcharian K., Sotelo J., Garcia E., Cano A., Gevorkian G. 1999. Characterization of cerebrospinal fluid antibody specificities in neuro-cysticercosis using phage display peptide library. *Clin Immunol.* (91) pags. 117-121.

63.- Chowdhury P., Viner J., 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. *PNAS.* (95) pags. 669-674.

64.- Tanaka A., Silva M., Torquato R., Noguti M., Sampaio C., Fritz H., Auerswald E. 1999. *FEBS letters.* (458) pags. 11-16.

65.- Peipp M., Simon N., Loichinger A., Baum W., Kerstin M., Zunino S., Fey G. 2001. An improved procedure for the generation of recombinant single-chain Fv antibody fragments reacting with human CD13 on intact cells. *J Immuno Meth.* (251) pags. 161-176.

66.- Tessmann K., Erhardt A., Haussinger D., Heintges T. 2002. Cloning and molecular characterization of human high affinity antibody fragments against hepatitis C virus NS3 helicase. *J Virol Methods.* (103) pags 75-88.

67.- Cárcamo J., Ravera M., Brissette R., Dedova O., Beasley J., Alam-Moghé A., Wan C., Blume A., Mandrecki W. 2002. Unexpected frameshifts from

gene to expressed protein in a phage-displayed peptide library. PNAS. (95) pags. 11146-11151.

68.- MacBeath G., Kast P 1998. UGA read-through artifacts-when popular gene expression systems need a patch. Biotechniques. (25) pags 789-94.

69.- Rondot S., Koch J., Breitling F., Dübel S. 2001. A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. Nature Biotech. (19) pags. 75-78.

70.- Selkoe D. 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. Phys rev. (81) pags. 741-766.

71.- Poul M., Becerril B., Nielsen U., Morrison P., Marks J. 2000. Selection of tumor specific internalizing human antibodies from phage libraries. J Mol Biol. (301) pags. 1149-1161.

72.- Lecerf J., Shirley T., Zhu Q., Kazantsev A., Amersdorfer P., Housman D., MecerA., Huston J. 2001. Human single-chain Fv intrabodies counteract in situ huntingtin aggregation in cellular models of Huntington's disease. PNAS. (98) pags. 4764-4769.

73.- Lue L., Walker D. 2002. Modeling Alzheimer's disease immune therapy mechanisms: interactions of human postmortem microglia with antibody-opsonized amyloid- β peptide. J Neuroscience Res. (70) pags. 599-610.

74.- Frenkel D., Solomon B., 2002. Filamentous phage as vector-mediated antibody delivered to the brain. PNAS. (99) pags. 5675-5679.

75.- Mohajeri M.H., Sainin K., Schultz J., Wollmer M., Hock C., Nitsch R. 2002. Passive immunization against β -amyloid peptide protects central nervous

system (CNS) neurons from increased vulnerability associated with an Alzheimer's disease –causing mutation. *J Biol Chem.* (277) pags. 33012-33017.

76. Demeester N., Mertens C., Caster H., Goethals M Vandekerckhove J., Rosseneu M., Labeur C. 2001. Comparison of the aggregation properties, secondary structure and apoptotic effects of Wild Type , Flemish and Dutch N-terminally truncated amyloid β peptides. *Eur J Neurosci.* (13) pags. 2015-2024.

77.- Bitan G., Kirkitadze M., Lomakin A. Vollers S., Benedek G., Teplow D. 2003. Amyloid β -protein ($A\beta$) assembly: $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ oligomerize through distinct pathways. *PNAS.* (100) pags. 330-335.

78.- Pfeifer M., Boncristiano S., Bondolfi L., Stalder A., S  ller T., Staufenbiel M., Mathews P., Jucker M., 2002. Cerebral hemorrhage after passive anti- $A\beta$ immunotherapy. *Science.* (298) 1379.

79.- Sambrook J., Russell D.W. 2001. *Molecular Cloning. A laboratory Manual.* 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. N.Y. pags. 1.25-1.26.