



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Investigaciones Biomédicas

## IDENTIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS ANTI BETA-AMILOIDE Y EVALUACIÓN *IN VITRO* DE SU CAPACIDAD NEUROPROTECTORA

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

MAYRA MEDÉCIGO RÍOS

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. GOHAR GERVORGYAN MARKOSIAN

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DE LOUDES MASSIEU TRIGO  
DR. RAFAEL SIMITRIO SAAVEDRA DURÁN

MÉXICO, D.F.

ABRIL, 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 18 de enero de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **MEDÉCIGO RÍOS MAYRA** con número de cuenta **93338620** con la tesis titulada "**IDENTIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS ANTI BETA-AMILOIDE Y EVALUACIÓN *IN VITRO* DE SU CAPACIDAD NEUROPROTECTORA**", realizada bajo la dirección de la **DRA. GOHAR GEVORGYAN MARKOSIAN**:

Presidente: DRA. ANA BRIGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ  
Vocal: DRA. MARÍA DE LOURDES MASSIEU TRIGO  
Vocal: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO  
Vocal: DRA. PENÉLOPE AGUILERA HERNÁNDEZ  
Secretario: DRA. GOHAR GEVORGYAN MARKOSIAN  
Suplente: DRA. ANGÉLICA ZEPEDA RIVERA  
Suplente: DRA. MARÍA ELENA CHÁNEZ CARDENAS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 22 de abril de 2010.

  
**Dr. Juan Núñez Farfán**  
Coordinador del Programa

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para la realización del presente estudio.

A los miembros de mi Comité Tutor:

Tutora: Dra. Gohar Gervorgyan Markosian, por la dirección de esta tesis y por hacer realidad lo que inició como un proyecto.

Dra María de Lourdes Massieu Trigo y Dr. Rafael Simitrio Saavedra Durán, por el apoyo que recibido para la realización de este trabajo y por participar en mi proceso de aprendizaje.

A los miembros del jurado: la Dra. Clorinda Arías, al Dr. Enrique Ortega, a la Dra. Penélope Aguilera, a la Dra. María Elena Chanez y a la Dra. Angélica Zepeda. Por sus valiosos comentarios y observaciones de este trabajo.

Por su apoyo y asesoría en la realización de este trabajo:

Al Dr. Karen Manoutcharian

Al Dr. Baltazar Becerril.

Al Biol. Exp. Gonzalo Acero.

A la M. en C. María Elena Munguía.

Al Dr. Agustín Luz-Madrigal.

A la M. en C. Tzipe Govezensky.

A Alicia Sampieri y Gabriel Orozco.

## **DEDICATORIA**

A Miguel y a Sofía

A mis padres y a mi hermana

A Elsa (q.e.p.d), Marcela, Lilia, Alejandro y Telma

A Alfonso, Mariana, Galya, Nadia, Diana, Roberto y Eduardo

A Antonio, Miguel Angel, Emilio, Diego, Alexander, Evelyn y Paulina

A Cristy, Cris y Toño

A mis amigos y compañeros del laboratorio

A todos les agradezco las continuas muestras de cariño y de ánimo, que me impulsaron a cumplir con esta meta.

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
Enfermedad de Alzheimer.....	7
<i>Epidemiología</i> .....	7
<i>Características neuropatológicas de la Enfermedad de Alzheimer</i> .....	8
<i>Características clínicas de la Enfermedad de Alzheimer</i> .....	11
<i>Bases genéticas de la Enfermedad de Alzheimer</i> .....	11
<i>Factores de riesgo</i> .....	13
<i>Tratamiento</i> .....	14
Péptido $\beta$ -amiloide .....	17
<i>Proteína precursora del amiloide (APP)</i> .....	17
<i>Estados de agregación y neurotoxicidad del péptido <math>A\beta_{42}</math></i> .....	21
<i>Hipótesis de la Cascada amiloide</i> .....	24
Modelos transgénicos de la Enfermedad de Alzheimer: ratones transgénicos .....	27
Estrategias terapéuticas de la Enfermedad de Alzheimer .....	30
<i>Inhibición de la producción del péptido <math>\beta</math>-amiloide</i> .....	30
<i>Inmunoterapia en modelos animales</i> .....	31
<i>Inmunoterapia en humanos</i> .....	35
<i>Mecanismos de acción de los anticuerpos anti <math>\beta</math>-amiloide</i> .....	36
Tecnología de Phage Display (despliegue en fagos filamentosos).....	37
<i>Bacteriofago M13</i> .....	37
<i>Bibliotecas de anticuerpos desplegados en fagos filamentosos</i> .....	38
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>41</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>42</b>
Objetivos Particulares .....	42
<b>ESQUEMA METODOLÓGICO</b> .....	<b>44</b>
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>45</b>
Inmunización de animales con el péptido $\beta$ -amiloide 1-42 ( $A\beta_{42}$ ) .....	45
<i>ELISA de sueros para detectar anticuerpos anti-<math>A\beta_{42}</math></i> .....	45
Construcción de una biblioteca de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) de inmunoglobulinas anti- $A\beta_{42}$ .....	46
Construcción de una biblioteca de VH de inmunoglobulinas anti- $A\beta_{42}$ .....	49
Bioselección de scFv y VH anti- $A\beta$ específicos a partir de una biblioteca de ratón inmune ...	50

Bioselección de scFv anti-ADDLs a partir de una biblioteca de scFv de humano no inmune .	52
Mapeo de epítomos de las clonas positivas (scFv y VH) usando péptidos truncados del péptido A $\beta$ <sub>42</sub> .....	52
Ensayos de inhibición de la neurotoxicidad mediada por ADDLs ( <i>A<math>\beta</math>-derived diffusible ligands</i> ) en células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), con todas las clonas positivas desplegadas en fago (scFv y VH) .....	53
Ensayos de inhibición de la neurotoxicidad mediada por ADDLs, en células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), con scFv solubles.....	58
Análisis por Inmunohistoquímica de secciones coronales de cerebros de ratones wt y tg2576 con scFv solubles .....	58
Análisis por Inmunofluorescencia de secciones coronales de cerebros de ratones wt y tg2576 empleando scFv y VH solubles.....	59
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>62</b>
Complejidad de la biblioteca de fragmentos de anticuerpos (scFv) anti-A $\beta$ <sub>42</sub> .....	62
Complejidad de la biblioteca de fragmentos de anticuerpos (VH) anti-A $\beta$ <sub>42</sub> .....	63
Bioselección de scFv y VH de ratón inmune anti-A $\beta$ <sub>42</sub> específicos .....	63
Bioselección de scFv anti-ADDLs específicos a partir de una biblioteca de scFv de humano no inmune .....	67
Mapeo de epítomos de las clonas positivas de scFv y VH usando fragmentos del A $\beta$ <sub>42</sub> .....	72
Ensayos de neurotoxicidad mediada por ADDLs en células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) .....	74
Ensayos de inhibición de la neurotoxicidad mediada por ADDLs en células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), por las clonas positivas de VH desplegadas en fago .....	75
Ensayos de inhibición de la neurotoxicidad mediada por ADDLs en células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), por clonas de scFv desplegadas en fago .....	77
Ensayo de inhibición de la toxicidad mediada por ADDLs en presencia de las clonas de scFv de humano solubles en células de neuroblastoma (SH-SY5Y) .....	79
Inmunohistoquímica de secciones coronales de cerebros de ratones wt y tg2576 con scFv solubles.....	80
Inmunofluorescencia de secciones coronales de cerebros de ratones wt y tg2576 empleando scFv y VH solubles .....	82
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>87</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>92</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>93</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>94</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>105</b>

## ABREVIATURAS

<b>A<math>\beta</math>:</b>	Péptido $\beta$ -amiloide
<b>ABTS:</b>	2,2-azino-di-(3-etilenziazolano-6-ácido sulfónico). Sustrato revelador de la enzima peroxidasa.
<b>Ach:</b>	Acetilcolina
<b>ADDLs:</b>	Ligandos difusibles del Péptido $\beta$ -amiloide ( <i>A<math>\beta</math>-derived diffusible ligands</i> )
<b>ApoE:</b>	Apolipoproteína E
<b>APP:</b>	Proteína Precursora del Amiloide
<b>BSA:</b>	Albúmina sérica bovina ( <i>Bovine Serum Albumine</i> )
<b>CDR:</b>	Región Determinante de la Complementariedad del Anticuerpo
<b>DAB:</b>	3, 3'- diaminobencidina
<b>DMSO:</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DO:</b>	Densidad Óptica
<b>EA:</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>EDTA:</b>	Ácido etilendiaminotetracético
<b>EFRH:</b>	Secuencia altamente inmunogénica del péptido $\beta$ -amiloide formada por los aminoácidos: ácido glutámico, fenilalanina, arginina e histidina. Esta secuencia comprende los residuos 3-6 del extremo amino terminal del péptido.
<b>ELISA:</b>	Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas ( <i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i> )
<b>FAD:</b>	Enfermedad de Alzheimer Familiar
<b>HFIP:</b>	Hexafluoroisopropanol
<b>IPTG:</b>	Isopropyl-beta-D-thiogalactopiranosida

<b>LTP:</b>	Potenciación a Largo Plazo
<b>PBS:</b>	Amortiguador salino de fosfatos
<b>PCR:</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>PEG:</b>	Polietilenglicol
<b>PhD:</b>	Despliegue en fago
<b>PHF:</b>	Filamentos helicoidalmente apareados
<b>PS1:</b>	Presenilina 1
<b>PS2:</b>	Presenilina 2
<b>RE:</b>	Retículo Endoplásmico
<b>SFB:</b>	Suero fetal bovino
<b>SNC:</b>	Sistema nervioso central
<b>TA:</b>	Temperatura ambiente
<b>TBE:</b>	Tris Borato EDTA
<b>TBS:</b>	Amortiguador salino TRIS
<b>TEA:</b>	Trietilamina
<b>ThT:</b>	Thioflavina T
<b>ufc</b>	Unidades de formación de colonia
<b>V<sub>H</sub>:</b>	Segmento genético de la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo
<b>V<sub>L</sub>:</b>	Segmento genético de la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo
<b>XTT:</b>	Sodium 3'-(1-[pheyaminocarbonyl]-3,4-tetrazolium)-bis-(4-methoxy-6-nitro)benzene sulfonic acid hydrate

## RESUMEN

El principal componente molecular de las placas seniles en cerebros de pacientes que padecen la Enfermedad de Alzheimer (EA) es el péptido beta-amiloide ( $A\beta$ ). La acumulación extracelular en el cerebro, parece jugar un papel importante en la neuropatogénesis de la EA.

Actualmente existen agentes para el tratamiento de los síntomas de la EA, que resultan en modestas mejoras en la función cognitiva. Se ha observado que la reducción del péptido  $A\beta$  por inmunoterapia mejora la función cognitiva en modelos animales de la enfermedad. La inmunoterapia emplea anticuerpos anti- $A\beta$  dirigidos a la degradación y/o prevención de agregados de este péptido. Sin embargo, el uso de anticuerpos completos se ha asociado a reacciones inflamatorias del cerebro, mientras que el uso de fragmentos de anticuerpo podría evitar las reacciones adversas generadas por el uso de anticuerpos completos.

En este trabajo se construyeron y evaluaron dos bibliotecas murinas inmunes de fragmentos de anticuerpos expresados en la superficie del fago filamentoso M13. Con estas bibliotecas se llevaron a cabo dos rondas de bioselección usando como antígeno al péptido  $A\beta_{42}$  fibrilar. Se evaluó la reactividad al  $A\beta_{42}$  fibrilar de cada clona seleccionada mediante un ensayo de ELISA. Se encontraron tres clonas positivas de VH (C1.27, C1.28 y C2.8). Los VH son fragmentos variables de cadena pesada de inmunoglobulinas. Se realizó un mapeo de epítomos del péptido  $A\beta$ , empleando fragmentos de éste péptido, las cuales reconocen la región media y/o carboxilo terminal del péptido  $A\beta_{42}$ .

En la actualidad se sabe que los oligómeros del péptido  $A\beta_{42}$  o ADDLs ( *$A\beta$  derived diffusible ligands*) son neurotóxicos y correlacionan con el daño cognitivo y la disfunción sináptica (Lambert, 1998). Por tal motivo, en este trabajo, se hizo una bioselección a partir de una biblioteca de scFv no inmune de humano, usando como antígeno oligómeros del péptido  $A\beta_{42}$  (ADDLs). Los scFv son anticuerpos de cadena sencilla del fragmento variable de las inmunoglobulinas. Se demostró que dos scFv seleccionados (scFv 3.20, scFv 4.8), reconocen la región media y/o carboxilo terminal, determinada por ensayos de ELISA usando fragmentos traslapados del péptido  $A\beta_{42}$ .

Como parte de los resultados, se encontró que tanto las clonas de VH (C1.27, C1.28 y C2.8) como las clonas de scFv (scFv 3.20 y scFv 4.8) desplegadas en fago, protegen *in vitro* a las células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) de la neurotoxicidad mediada por los ADDLs. Con el fin de evaluar si conservan su actividad

neuroprotectora, se generaron scFv en forma soluble y se encontró que también protegen *in vitro* a las células SH-SY5Y de la neurotoxicidad mediada por los ADDLs.

Se demostró mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, que los scFv y VHs solubles, reconocen agregados del péptido A $\beta$  en cerebro de ratones transgénicos, lo que indica que no solamente reconocen al péptido sintético, sino que también reconocen agregados naturales en cerebro, *in vivo*.

Las tres características más importantes de los anticuerpos recombinantes seleccionados en este trabajo, en la búsqueda de candidatos terapéuticos de la EA, son: la ausencia de la región Fc (fragmento cristalizante, que no fija antígenos, que se obtiene de una molécula de inmunoglobulina tras la digestión con papaína), el reconocimiento específico de las clonas hacia la región central y carboxilo terminal del péptido A $\beta$  y la capacidad neuroprotectora de estas clonas.

## ABSTRACT

The main molecular component of the cerebral senile plaques is the amyloid-beta ( $A\beta$ ) peptide. The accumulation of  $A\beta$  peptide in the brain has been hypothesized to play a central role in the neuropathogenesis of Alzheimer's Disease (AD).

Currently there are agents for the treatment of the EA symptoms that result in modest improvements in the cognitive function. It has been observed that the reduction of the  $A\beta$  by immunotherapy improves the cognitive function in animal models of the illness. Immunotherapy uses anti- $A\beta$  antibodies directed to the degradation and/or the prevention of this peptide adds, however, the use of the complete antibodies has been associated with inflammatory reactions of the brain. The use of antibody fragments could prevent adverse reactions generated by the use of complete antibodies.

In this work two immune mouse antibodies libraries were built and evaluated, expressed in the surface of the phage M13. With these libraries, two rounds of bioselection were made, using fibrillate  $A\beta_{42}$  as an antigen. The reactivity at fibrillate  $A\beta_{42}$  of every clone was evaluated, selected by an ELISA essay. Three positive clones of VH (C1.27, C1.28 y C2.8) were found. For the positive clones of VH, a map of the  $A\beta$  epitopes was made, using fragments of this peptide that recognize the medium region and/or C-terminal of  $A\beta_{42}$ .

Nowadays, it is known that the oligomers of  $A\beta_{42}$  peptide or ADDLs ( $A\beta$  derived diffusible ligands) are neurotoxic and correlated to the cognitive damage and the synaptic dysfunction (Lambert, 1998). For this reason, in this work, a bioselection was made based in a scFv no immune human library, using oligomers of  $A\beta_{42}$  (ADDLs) as an antigen. It has been proved that two selected scFv (scFv 3.20, scFv 4.8), recognize the medium region and/or C-terminal, determined by ELISA essay using  $A\beta_{42}$  fragments.

As part of the results, it has been found that the clones of the VH (C1.27, C1.28 y C2.8) as well as the clones of the scFv (SH-SY5Y) protect from the neurotoxicity of ADDLs *in vitro*. In order to evaluate if they retain their neuroprotective activity, scFv was generated in a soluble form and it was found that they also protect the cells SH-SY5Y *in vitro* of the neurotoxicity mediated by the ADDLs.

It was demonstrated by immunohistochemistry and immunofluorescence that the soluble scFv and VHs recognizes the  $A\beta$  brain aggregates of the transgenic mice, this indicates not only that they recognize the synthetic peptide, but that they also recognize natural brain adds.

The three most important characteristics of the recombinant antibodies selected in this work, in the search for therapeutic EA candidates are: the absence of the Fc region, the specific recognition of the clones towards the central and C-terminal region of the A $\beta$  and the neuroprotective capacity of these clones.

## INTRODUCCIÓN

### ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la demencia más frecuente en adultos mayores y fue bautizada por Emil Kraepelin en honor al neuropatólogo alemán Alois Alzheimer (1864-1915). En 1907, Alzheimer describió las manifestaciones clínicas y las características patológicas de la demencia en una mujer de 51 años, las cuales en general se presentan como la pérdida de las habilidades cognitivas (Alzheimer, 1907).

La EA se clasifica de acuerdo a la edad de aparición. Cuando la enfermedad ocurre antes de los 65 años de edad se le llama de aparición temprana (*early-onset*) o enfermedad de Alzheimer Familiar (FAD), que representa menos del 2% de los casos, mientras que la de aparición tardía (*late-onset*) se denomina enfermedad de Alzheimer esporádica, y representa el 98% de los casos.

---

### EPIDEMIOLOGÍA

La EA es una de las enfermedades mentales más frecuentes: constituye cerca del 20% de todos los casos en los hospitales psiquiátricos y un porcentaje incluso más grande en las instituciones residenciales para ancianos (Victor y Ropper, 2002).

La prevalencia o porcentaje de personas menores de 65 años con la EA es inferior al 1%, aumenta de 5 a 10% a los 65 años y de 30-40% a partir de los 85 años. La incidencia propia de la edad, o el número de casos que aparecen en un periodo concreto de tiempo, también aumenta bruscamente desde menos del 1% al año antes de los 65 años hasta 6% al año a partir de los 85 años. La duración media de los síntomas desde el diagnóstico hasta la muerte puede ser de 10 años. Además, la enfermedad, cuya incidencia es mayor entre las mujeres, sobre todo a partir de los 85 años, también tiene una mayor duración (alrededor de 16 años) en los pacientes de sexo femenino (Small y Mayeux, 2000). En las familias donde existe al menos una persona afectada, las mujeres con un parentesco de primer grado corren un riesgo mayor de sufrir la EA que los hombres (Small y Mayeux, 2000).

---

# CARACTERÍSTICAS NEUROPATOLÓGICAS DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

---

## CAMBIOS MACROSCÓPICOS

En las etapas avanzadas de la enfermedad el encéfalo presenta un aspecto atrófico difuso y su peso suele reducirse 20% o más. Las circunvoluciones cerebrales se estrechan y las fisuras se amplían. El tercer ventrículo y los ventrículos laterales aumentan de tamaño de manera simétrica en grado variable. Por lo general el proceso atrófico comprende los lóbulos frontales, temporales y parietales, pero los casos varían mucho. La atrofia extrema del hipocampo, es el hallazgo más destacado y se considera fundamental para el diagnóstico de la enfermedad. Además de la pronunciada pérdida de neuronas en el hipocampo, se observa pérdida neuronal en las regiones adyacentes a la corteza temporal y medial, sobre todo la corteza entorrinal, la circunvolución parahipocampal y el subículo. El núcleo anterior del tálamo, el núcleo septal y la banda diagonal de Broca, la amígdala y algunas regiones del tallo cerebral del sistema monoaminérgico también se destruyen. De igual manera, el número de neuronas colinérgicas de los núcleos basales de Meynert (la sustancia innominada) y el *locus coeruleus* se encuentra reducido (Victor y Ropper, 2002).

---

## CAMBIOS MICROSCÓPICOS

### *PLACAS NEURÍTICAS (SENILES)*

---

En condiciones normales, el péptido A $\beta$  está presente en pequeñas cantidades como monómero soluble que circula en el líquido cerebroespinal y en la sangre. Sin embargo, en los pacientes con EA los niveles de este péptido se incrementan y se acumulan como placas fibrilares insolubles.

Las placas neuríticas son uno de los dos marcadores inequívocos para el diagnóstico de la EA, se encuentran presentes en áreas de la neocorteza, el hipocampo y la amígdala. Estas placas contienen depósitos extracelulares del péptido A $\beta$  fibrilar, que se presentan como masas de fibrillas en forma de estrella. Dentro de los depósitos amiloides y a su alrededor se encuentran neuritas distróficas. Con frecuencia, estas neuritas se encuentran dilatadas y presentan anomalías ultraestructurales que incluyen lisosomas alargados, mitocondrias numerosas y filamentos helicoidales apareados. Estas placas también se encuentran íntimamente asociadas a microglía, que expresa en su superficie antígenos de activación, como el CD45 y el HLA-DR, y están rodeadas de astrocitos reactivos que despliegan filamentos gliales abundantes

(Dickson, 1997). La microglía usualmente se encuentra dentro del centro amiloide de la placa neurítica o en la región adyacente a éste, mientras que los astrocitos se agrupan en forma de anillo rodeando el exterior de la placa senil. Estos depósitos amiloides provocan una pérdida sináptica entre las neuronas, con la consiguiente pérdida de la comunicación neuronal. La especie predominante del péptido A $\beta$  fibrilar presente en las placas neuríticas es el péptido A $\beta$  de 42 residuos (A $\beta$ <sub>42</sub>) (Jarrett et al, 1993). El diámetro de las placas neuríticas varía de 10 a >120  $\mu$ m; la densidad y el grado de compactación de las fibras amiloides que forman estas placas también tienen un alto grado de variación.

### *PLACAS DIFUSAS (PREAMILOIDES)*

---

Las placas difusas son depósitos del péptido A $\beta$  que carecen del aspecto fibrilar y compacto de las placas neuríticas. Muchas de estas placas se encuentran en la corteza límbica y de asociación, al igual que en regiones del cerebro que no están implicadas en la sintomatología típica de la EA (por ejemplo el tálamo, caudado, putamen y cerebelo), y presentan un patrón granular y no un centro compacto fibrilar. Además, estas placas difusas carecen o contienen pocas neuritas distróficas y muestran presencia del péptido A $\beta$ <sub>40</sub> (Iwatsubo et al, 1994).

### *MARAÑAS NEUROFIBRILARES*

---

Las marañas neurofibrilares constituyen el otro marcador inequívoco para el diagnóstico de la EA, se componen de filamentos helicoidales apareados (PHF), formados por proteína tau hiperfosforilada (Grundke-Iqbal et al, 1986; Ihara et al, 1986). Las neuronas que presentan estas marañas se encuentran en la corteza entorrinal, el hipocampo, el giro parahipocampal, la amígdala, las cortezas de asociación frontal, temporal, parietal y occipital.

La proteína tau pertenece a una familia de proteínas heterogéneas derivadas de un gen que, por procesamiento alternativo del mRNA, genera 6 isoformas en el adulto normal, cuyos pesos moleculares oscilan entre 45 y 68 kDa.

Tau es principalmente una proteína neuronal, localizada en axones, aunque se ha identificado en diferentes tipos de glía, sobre todo en algunas enfermedades neurológicas (Arrasate et al, 1997). En las neuronas, tau puede estar asociada a la membrana plasmática en una interacción que podría estar regulada por la fosforilación de la proteína misma, o por su interacción con microtúbulos (Arrasate et al, 1997, 2000; Brandt et al, 1995; Ávila et al, 2002).

En la década de los ochenta varios trabajos definieron a tau como una fosfoproteína (Baudier et al, 1987; Grundke-Iqbal et al, 1986; Ihara et al, 1986). Existen 79 sitios putativos de fosforilación de serina o treonina en la isoforma de tau más grande que se encuentra en el sistema nervioso central (SNC), la que contiene 441 residuos.

Desde el trabajo pionero de Weingarten y colaboradores (1975) se ha sugerido que tau facilita la polimerización de la tubulina. Después, mediante ensayos *in vitro*, se ha encontrado que tau estabiliza a los microtúbulos previamente polimerizados y facilita la polimerización de la tubulina para formar microtúbulos (Bre y Karsenti, 1990; Drechsel et al, 1992; Maccioni et al, 1989; Panda et al, 1995). Además, tau es capaz de suprimir la dinámica microtubular confiriendo así rigidez axonal (Bre y Karsenti, 1990; Panda et al, 1995).

### *NEURITAS DISTRÓFICAS*

---

Las neuritas distróficas son conjuntos de procesos neuronales anormales (Hof y Morrison, 1994). Métodos estándares de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia han sido utilizados para analizar los epítomos expresados dentro de los conjuntos de neuritas distróficas en la EA. Por medio de microscopía electrónica se ha encontrado una pérdida sináptica del 25 a 40% en el hipocampo, la corteza entorrinal, el núcleo *coeruleus* y el *basalis*. Por medio de estudios inmunohistoquímicos con sinaptofisina, un marcador que se emplea para cuantificar las conexiones de las células cerebrales, se observó que la pérdida sináptica es mayor que la muerte neuronal y precede al depósito amiloide, pero que se relaciona con la exposición a oligómeros del péptido A $\beta$  (Masliah et al, 1993).

### *MICROANGIOPATÍA AMILOIDE*

---

La microangiopatía amiloide en la EA consiste en depósitos amiloides en pequeñas arteriolas, vénulas y capilares dentro del cerebro. Esta angiopatía microvascular se caracteriza, a nivel microscópico, por fibras amiloides presentes en la base de la membrana abluminal de los vasos sanguíneos, en ocasiones con una extensión de las fibras a los alrededores del neuropilo perivascular (Selkoe, 2001). Los depósitos del péptido A $\beta$  presentes en los vasos sanguíneos están formados principalmente del péptido A $\beta_{40}$ , aunque existe evidencia de que los depósitos iniciales en los vasos son de la especie A $\beta_{42}$  (Suzuki et al. 1994).

---

## **CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Las manifestaciones de la EA evolucionan de manera uniforme, desde los signos iniciales de alteración de la memoria hasta una pérdida cognoscitiva intensa. La evolución es progresiva y termina inevitablemente con un deterioro físico y cognitivo completo y muerte. A veces, se observa cierta estabilización, es decir, la alteración cognoscitiva no cambia durante uno o dos años, pero luego se reanuda la progresión.

La manifestación habitual e inicial es una alteración intermitente de la memoria reciente, mientras que la memoria de los hechos remotos no parece dañada. Según avanza el proceso, se pueden descubrir, mediante exámenes específicos, defectos del lenguaje, del razonamiento abstracto y de la función ejecutiva. Del 5 al 8% de los pacientes con EA padece depresión mayor con insomnio o anorexia. Las ideas delirantes y la conducta psicótica aumentan con la progresión de esta enfermedad y siguen manteniéndose en torno al 20%. Puede coexistir agitación hasta en el 20% de los pacientes, que aumenta según avanza la enfermedad. Las alucinaciones se dan con la misma frecuencia y pueden ser visuales o auditivas.

Con excepción del estado mental, la exploración neurológica suele ser normal, pero en las fases avanzadas de la enfermedad se ven rasgos extrapiramidales del tipo de rigidez, bradicinesia (disminución de la velocidad de los movimientos normales), marcha titubeante y cambios posturales. Por lo demás, las funciones motoras y sensitivas primarias se conservan (Small y Mayeux, 2000).

---

## **BASES GENÉTICAS DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Se han descrito algunas familias con EA autosómica dominante. Las mutaciones de tres genes: el gen de la proteína precursora del amiloide (APP) en el cromosoma 21, el de la presenilina 1 (PS1) en el cromosoma 14 y el de la presenilina 2 (PS2) en el cromosoma 1), determinan una forma autosómica dominante de la enfermedad que puede comenzar a edades tempranas, incluso en la tercera década de la vida. La frecuencia de casos que obedecen a mutaciones en cada uno de estos tres genes es distinta. Mientras que las mutaciones en los genes PS2 y especialmente en APP son muy infrecuentes, las que aparecen en el gen PS1 explican la gran mayoría de casos de EA de inicio precoz con herencia autosómica dominante. Aunque en su conjunto todas estas formas de EA no suponen más del 1% de la totalidad de casos, su descubrimiento ha resultado muy importante para avanzar en el conocimiento de los mecanismos patogénicos de la enfermedad.

---

## MUTACIONES EN EL GEN DE LA APP

La APP está codificada en la región q21 del cromosoma 21 (Kang et al, 1987; Goldgaber et al, 1987; Robakis et al, 1987; Tanzi et al, 1987). En la actualidad se sabe que al menos algunos casos de EA se relacionan con mutaciones en la APP. Este hallazgo proporcionó un fuerte respaldo a la hipótesis de que el péptido A $\beta$  es un elemento fundamental en la patogénesis de la EA. Esta hipótesis es conocida como la hipótesis de la “cascada amiloide”, que se ha desarrollado de manera importante a lo largo de la última década. Esta hipótesis establece que la formación y agregación del péptido A $\beta$  es el evento desencadenante de todas las demás alteraciones observadas en la EA (Hardy y Allsop, 1991; Huse y Doms, 2000). En la actualidad se sabe que las mutaciones de la APP corresponden a muy pocos casos de la enfermedad. Se han descrito una decena de mutaciones claramente ligadas con la EA en todo el mundo, aunque para su diagnóstico es baja la probabilidad de encontrar dichas mutaciones

---

## MUTACIONES EN LOS GENES DE PRESENILINAS

La presenilina 1, está codificada por un gen (PSEN1) que mapea en la región q24.3 del cromosoma 14. La predicción de su estructura secundaria la presenta como una proteína integral de membrana, con ocho dominios transmembranales, y se localiza mayoritariamente en membranas asociadas al retículo endoplásmico. A diferencia de la APP, más de 80 mutaciones distintas ya se han identificado en la región codificante de este gen (<http://www.alzforum.org>), además de algunas mutaciones y polimorfismos en la región promotora (Aldudo et al, 1999; Theuns y Van Broeckhoven, 2000; van Duijn et al, 1999). La gran mayoría de estas mutaciones se deben al cambio de una base en el genoma que da lugar a un cambio de aminoácido en la proteína (mutación *missense*), con la excepción de dos deleciones.

Las mutaciones patogénicas se extienden a lo largo de toda la estructura de la proteína, aunque hay una mayor densidad de mutaciones en dos exones (el 5 y, principalmente, el 8), que codifican para dominios transmembranales, lo que sugiere que el mantenimiento estructural de dichas regiones es fundamental para la funcionalidad de la proteína.

Las mutaciones en PS1 son responsables de la gran mayoría de los casos de EA monogénica, y son también por regla general las más agresivas en cuanto a un inicio precoz de los síntomas y a una evolución rápida de la enfermedad (Cruts y Van Broeckhoven, 1998).

Poco después del hallazgo del gen PS1, con base a la homología en la secuencia, se identificó el gen de la presenilina 2 (PSEN2) como portador de mutaciones responsables del ligamiento de la EA con el cromosoma 1 (Rogaev et al, 1995; Levy-Lahad et al, 1995). Las mutaciones descritas en el gen PS2 (<http://www.alzforum.org>) son mucho menos abundantes que las de su homólogo PS1, y la mayoría de ellas se encuentra en los dominios transmembranales conservados entre las dos proteínas.

---

## FACTORES DE RIESGO

---

### EDAD

La edad es el factor de riesgo conocido más importante para desarrollar la EA. El número de personas con EA se duplica cada cinco años después de los 60 años hasta los 80 años de edad.

---

### APOLIPOPROTEÍNA E

De los múltiples *loci* y genes candidatos que hasta la fecha se han descrito como factores de riesgo para la EA, el único que se repite de manera consistente es el de la apolipoproteína E (apoE), una proteína reguladora del metabolismo de los lípidos, que constituye por tanto el principal gen de susceptibilidad conocido para la EA.

La proteína apoE, de peso molecular de 34 kDa, es uno de los principales componentes de las lipoproteínas plasmáticas. Juega un papel fundamental en el metabolismo de las lipoproteínas, participando en el transporte celular de los lípidos mediante la interacción de las lipoproteínas con receptores específicos. La apoE presenta tres isoformas comunes (E2, E3 y E4) codificadas por un único gen en el cromosoma 19 (Mahley, 1988; Weisgraber, 1994). En el cerebro son los astrocitos y la microglía las principales células productoras de apoE, aunque en menor cantidad, también las neuronas producen apoE (Xu, 1998).

El alelo apoE4 está ampliamente representado en los pacientes con EA (40% frente a un 5-20% en poblaciones normales de distintas etnias) pero, además, se ha sugerido que desvía en unos 20 años la edad de comienzo de la EA tardía (Tandon et al, 2000).

El mecanismo por el cual apoE4 está implicada en la patogenia de la EA no está claro. La apoE4 participa en el transporte del colesterol en el cerebro, la cual es menos eficiente que las otras variantes en reutilizar lípidos de membrana y en el arreglo neuronal (Poirier, 1994).

Por otro lado, hay gran cantidad de estudios que la implican en la amiloidogénesis, actuando como chaperona que facilitaría la agregación del péptido A $\beta$  o como proteína capaz de capturar el péptido impidiendo su agregación (Tomiyama et al, 1999; Poirier, 2000). En cuanto a otras posibles funciones relevantes en la EA, se propone que la apoE4 puede actuar protegiendo a las neuronas del daño oxidante propio del envejecimiento, menos eficientemente que otras isoformas (Miyata y Smith, 1996). Otros estudios sugieren que la implicación de la apoE en la patogenia puede estar mediada por su interacción con la proteína tau, principal componente de las marañas neurofibrilares (Lovestone et al, 2001).

---

## OTROS FACTORES DE RIESGO

Aunque con poca consistencia, la EA se ha relacionado también con traumatismos craneoencefálicos, consumo de dietas altas en calorías o grasa, un estilo de vida sedentario, metabolismo del colesterol, exposición a ciertos metales como el cobre y el hierro, edad parental al nacer y síndrome de Down de un familiar de primer grado (Mayeux, 2003). En varios estudios se ha observado que la estrogenoterapia de reposición para las mujeres posmenopáusicas y el consumo regular de antiinflamatorios tanto por varones como por mujeres se han acompañado de un menor riesgo de la EA (Small y Mayeux, 2000).

---

## TRATAMIENTO

El conocimiento de disturbios en la neurotransmisión en la EA ha permitido el desarrollo de fármacos con efectos en la sintomatología de la enfermedad, los cuales han sido aprobados en diferentes países. Los avances en la investigación de la patogénesis de la EA, ha permitido conocer nuevos candidatos farmacológicos con un potencial modificador de la enfermedad, los cuales están siendo evaluados en pruebas clínicas. Los datos epidemiológicos han sugerido fármacos candidatos adicionales, los cuales están siendo investigados.

Varias sustancias psicoactivas fueron propuestas para preservar o restablecer la cognición, el comportamiento y las habilidades funcionales del paciente afectado por la EA. Sin embargo, los efectos de los fármacos actualmente aprobados para el tratamiento de la EA se limitan al retraso de la evolución natural de la enfermedad, lo que sólo permite una mejora temporal del estado funcional del paciente, más no su cura.

---

## TRATAMIENTOS SINTOMÁTICOS

En 1976, Peter Davies, que estaba examinando cerebros de pacientes con EA a los que se les había realizado la autopsia, informó de la muerte de células nerviosas que normalmente producían el neurotransmisor acetilcolina (Ach). Descubrió que existe una reducción notable de la acetiltransferasa de colina (ChAT) y la Ach en el hipocampo y la neocorteza de los pacientes con EA. Este desequilibrio colinérgico se atribuyó a la pérdida de células en los núcleos basales del prosencéfalo (núcleo basal de Meynert), donde se origina la mayor parte de las terminales nerviosas colinérgicas de la neocorteza (Whitehouse et al, 1981).

La Ach es un neurotransmisor importante en los procesos de memoria y aprendizaje, lo cual ha sido refrendado por numerosos modelos experimentales animales (Lamour, 1994). El déficit colinérgico que se observa en el cerebro de los pacientes con EA, parece desempeñar un papel relevante, aunque no exclusivo, en el deterioro cognitivo propio de la enfermedad. El encéfalo de pacientes con EA también muestra pérdida de neuronas monoaminérgicas, además de las colinérgicas, y disminución de las funciones noradrenérgica, GABAérgica y serotoninérgica en la neocorteza afectada. Así mismo está reducida la concentración de aminoácidos transmisores, en particular glutamato, en las áreas cortical y subcortical (Sasaki et al, 1986).

---

## INHIBIDORES DE LA ACETILCOLINESTERASA

En la actualidad, los preparados anticolinesterásicos son los únicos aprobados en Estados Unidos por la *Food and Drug Administration* para tratar la EA. La única estrategia farmacológica que ha demostrado hasta ahora cierta eficacia para mejorar los síntomas del paciente que sufre EA, es la encaminada a evitar la degradación del neurotransmisor Ach, con el objeto de contrarrestar su déficit cerebral (Standaert y Young, 2001). Por ejemplo, fármacos que inhiben de forma reversible la acetilcolinesterasa cerebral, como la tacrina, el donepezilo, la rivastigmina o la galantamina, evitan la degradación del neurotransmisor. De esta manera favorecen la elevación de los niveles de Ach en la hendidura sináptica, facilitando los efectos del neurotransmisor, tanto a nivel nicotínico como a nivel muscarínico, lo que en ambos casos contribuye a mejorar la cognición.

---

## TRATAMIENTO DE LOS SIGNOS CONDUCTUALES

Entre los síntomas neuropsiquiátricos, afectivos y de conducta en la EA podemos mencionar depresión, agitación, agresividad, alucinaciones, insomnio, ideas paranoides, entre otros. Es imprescindible adquirir un adecuado manejo en el uso de

todos estos fármacos sintomáticos, cuya administración debe individualizarse en cada caso y ser rigurosamente supervisada.

Los antipsicóticos más utilizados son los neurolépticos. Su uso debería ser considerado tan sólo para aquellas situaciones catalogadas como moderadas o graves, el síntoma a tratar: agresividad física, alucinaciones, ideas delirantes, etc.

Otros fármacos para el tratamiento de los signos conductuales son los ansiolíticos, fundamentalmente las benzodiazepinas (BZD), que se orientan a disminuir las conductas de agitación y las alteraciones del sueño. Otro síntoma que se presenta en la EA es la depresión, para la cual se administran antidepresivos (entre los de primera elección se encuentra la trazodona), además, son útiles cuando se acompaña de agitación y trastornos del sueño. Los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) son antidepresivos ampliamente utilizados (Burke et al, 1994) por presentar apenas efectos secundarios en comparación con los antidepresivos tricíclicos.

---

## CANDIDATOS TERAPÉUTICOS CON BASE EN LA EPIDEMIOLOGÍA DE LA EA

Las placas seniles en la EA están acompañadas por inflamación local. La mayoría de los estudios epidemiológicos sugieren que el riesgo de padecer la enfermedad es menor en los pacientes tratados entre los 40 y 50 años de edad con antiinflamatorios no esteroides (NSAIDs), sin embargo, estos tratamientos no revierten el proceso degenerativo en pacientes con la patología previamente establecida (Aisen, 2002).

Diversos estudios reportan efectos beneficios del empleo de los estrógenos en la memoria de las mujeres postmenopáusicas. Por otra parte, estudios epidemiológicos muestran una prevalencia de EA menor en mujeres con terapia hormonal sustitutiva, o que en estas se presenta más tardíamente y con menor severidad. Las acciones de los estrógenos en el cerebro se relacionan con su influencia en la apoE, el incremento de la densidad de las terminales sinápticos, el incremento del flujo sanguíneo cerebral, previenen la muerte neuronal, así como la interacción con el factor de crecimiento nervioso y acción en el sistema colinérgico (Mulnard et al, 2000). Sin embargo, pruebas clínicas con estrógenos no muestran una reducción en el riesgo de la enfermedad (Almeida y Flicker, 2005).

Se ha observado que existe una asociación entre el metabolismo del colesterol y la EA. El alelo E4 de la apoE, que participa en el metabolismo del colesterol, es un factor de riesgo genético para la aparición tardía de la EA. En el SNC, la apoE promueve la

formación de amiloides insolubles. Cuando se reduce el colesterol neuronal en los animales de experimentación, se reduce la síntesis del péptido A $\beta$ . Al parecer es biológicamente plausible que la reducción del colesterol en suero puede afectar el desarrollo de la EA. Existen estudios que reportan que el uso de estatinas (medicamentos para bajar el colesterol) se asocia con una menor incidencia de la EA (Rea et al, 2005). Actualmente se están haciendo pruebas clínicas que confirmen la hipótesis de que las estatinas protegen contra la EA.

Un gran número de estudios epidemiológicos sugieren que el consumo de antioxidantes, como la vitamina E, puede reducir el riesgo de padecer la EA (Engelhart et al, 2002; Morris et al, 2002). Actualmente, se están haciendo pruebas clínicas para determinar el efecto de la vitamina E en la progresión de la EA.

## **PÉPTIDO $\beta$ -AMILOIDE**

El péptido A $\beta$  es una proteína insoluble de aproximadamente 4 kDa y varía en longitud de 39 a 43 aminoácidos. El péptido A $\beta$  se produce a partir del procesamiento proteolítico de la APP. Este péptido se encuentra de manera constitutiva en el líquido cerebrospinal y en el plasma de personas que no presentan la EA. Las dos formas predominantes de A $\beta$  son: el A $\beta_{40}$  y el A $\beta_{42}$ . En la EA, el A $\beta_{40}$  es el más abundante en circulación y con mayor solubilidad, mientras que el A $\beta_{42}$  es menos soluble y se acumula en forma de depósitos en el cerebro, como principal componente de las placas neuríticas. Actualmente no se conoce con certeza el papel fisiológico de este péptido (monómero).

---

## **PROTEÍNA PRECURSORA DEL AMILOIDE (APP)**

El péptido A $\beta$ , el principal componente de las placas seniles, se origina a partir de la APP. La APP representa un grupo de polipéptidos con expresión ubicua en los diferentes tejidos cuya heterogeneidad procede tanto del procesamiento diferencial del RNA como de las modificaciones postraduccionales. La APP, es una proteína glicosilada transmembranal Tipo 1, que contiene una porción N-terminal extracelular, un dominio transmembranal y un dominio C-terminal citoplasmático. La porción N-terminal es una región rica en cisteínas y presenta un dominio del factor de crecimiento (GFD), que une a la heparina y puede estimular el crecimiento de neuritas (Ohsawa et al, 1997; Rossjohn et al, 1999) y un dominio de unión al cobre (CuBD) (Barnham et al, 2003). Después de la región rica en cisteínas se encuentra una región rica en ácidos, el dominio de inhibidor de proteasa de tipo Kunitz (KPI) y el dominio OX2 (Tanaka et al, 1988; Tanzi et al, 1988). Existen diferentes isoformas de la APP,

que se derivan del *splicing* alternativo del mRNA de dicha proteína, nombradas de acuerdo a su longitud de aminoácidos. Dentro de éstas se encuentran las isoformas APP770, APP751 y APP695. La isoforma APP695 se expresa principalmente en neuronas y es el transcrito de APP más abundante en el cerebro (Neve et al, 1988). La diferencia entre las isoformas con 751/770 y 695 aminoácidos radica en la presencia en las dos primeras de un exón que codifica para una región homóloga al motivo inhibitor serinproteasa de tipo Kunitz. Después de estos dominios se encuentra un dominio glicosilado que se le llama E2 o D6 o CAPPD (Wang and Ha, 2002) y una región no estructurada previa al dominio transmembranal. El dominio C-terminal citoplásmico se encuentra relacionado en algunas funciones celulares a través de la interacción con múltiples proteínas (De Strooper y Annaert, 2000).

La función o funciones de la APP *in vivo* siguen siendo desconocidas. Kang y colaboradores (1987) han señalado las similitudes entre la APP y receptores de superficie celular. Esta idea se apoya en el hallazgo de que el dominio citoplásmico de la APP, puede catalizar guanosina trifosfato (GTP) intercambiando con Go. Esto sugiere que la APP puede funcionar como un receptor acoplado a Go (Nishimoto et al, 1993). Si este hallazgo es cierto, su ligando activo es desconocido.

Varios estudios han sugerido que la APP (completa o sus fragmentos) tiene diversas funciones potenciales, por ejemplo como molécula de adhesión, promoviendo interacciones célula-célula o célula-matriz extracelular (Mattson, 1997). Así mismo, se ha propuesto que contribuye a la regulación del crecimiento de neuritas, la promoción de la sobrevivencia celular, la protección contra una variedad de efectos neurotóxicos, estimulación de la sinaptogénesis y la modulación de la plasticidad sináptica.

La APP tiene al menos un sitio de unión con alta afinidad a heparina (Multhaup et al, 1995), un sitio de unión a colágeno (Behr et al, 1996), un motivo de unión a integrina (secuencia de aminoácidos RHDS (arginina, histidina, aspartato, serina) que corresponde a los residuos 5-8 del péptido A $\beta$ ) (Ghiso et al, 1992) y se ha observado que se une a laminina, colágeno y a proteoglicanos heparán sulfato (Breen et al, 1991).

Hay evidencia de que la APP existe en equilibrio entre monómero y dímero en la membrana (Scheuermann et al, 2001; Soba et al, 2005). La unión de la heparina de alto peso molecular induce la dimerización (Gralle et al, 2006), ésta puede estar relacionada con la producción del A $\beta$ , que se incrementa cuando la APP se encuentra dimerizada (Scheuermann et al, 2001).

La interacción entre los iones de cobre y el CuBD puede modular la producción del péptido A $\beta$ . El tratamiento de las células CHO que sobreexpresan la APP en presencia de Cu(II) extracelular, reducen la producción del péptido A $\beta$  (Borchardt et al, 1999). Además, la unión del cobre al CuBD, se puede unir al fragmento de la APP del péptido A $\beta$ , lo que induce la agregación del péptido y favorece la producción de especies reactivas de oxígeno vía química Fenton (Smith et al, 2007).

La sAPP $\alpha$ , que es el fragmento que genera la  $\alpha$ -secretasa, tiene un efecto promotor del crecimiento en fibroblastos y cultivos neuronales. Esta actividad reside en la secuencia de aminoácidos RERMS en los residuos 328-332 de la APP695 (Jin et al, 1994). Al sAPP $\alpha$  se le adjudican papeles fisiológicos, ya que este fragmento es liberado de las terminales presinápticas, en respuesta a la actividad eléctrica. Este fragmento puede estar involucrado en la regulación de la excitabilidad neuronal, el aumento de la plasticidad sináptica, el aprendizaje y memoria, posiblemente activando receptores de superficie celular que modulen la actividad de canales de potasio y que activen la transcripción del factor de NF- $\kappa$ B (Scheuner et al, 1996).

Por otra parte, se ha observado un efecto neuroprotector de la sAPP $\alpha$  (Mattson, 1997), ya que puede proteger del daño neuronal mediado por el péptido A $\beta$  y glutamato (Mattson, 1993).

---

## PROCESAMIENTO DE LA APP

El procesamiento de la APP puede ocurrir de dos maneras distintas. Por un lado, la ruta no amiloidogénica incluye el procesamiento proteolítico de la APP por la actividad de  $\alpha$ -secretasa en la superficie celular, dentro de la secuencia del péptido  $\beta$ -amiloide (entre el residuo 16 y 17 del péptido A $\beta$ ), el cual genera una proteína soluble de 612 aminoácidos (sAPP $\alpha$ ). La identidad de  $\alpha$ -secretasa se ha identificado como las enzimas ADAM17, ADAM9 y ADAM10.

El fragmento C-terminal de la APP permanece anclado a la membrana y es procesado proteolíticamente por la actividad de  $\gamma$ -secretasa, generando el fragmento p3 (Hass et al, 1992ab; Sisodia, 1992; Weidemann et al, 1989). La  $\gamma$ -secretasa es un complejo formado por presenilina1, APH-1, PEN-2 y nicastrina (Drewes, 2003).

Actualmente la denominación de ruta no amiloidogénica de la APP no ha cambiado. Sin embargo, ahora se sabe que la actividad de  $\alpha$ -secretasa en conjunto con la actividad de  $\gamma$ -secretasa, genera un péptido truncado del péptido A $\beta$ . Este péptido consta de los residuos 17 al 42 (A $\beta$ <sub>17-42</sub>) conocido como el fragmento p3; una especie

del péptido A $\beta$  presente en extractos de cerebro de pacientes con EA, ya que también se agrega y además, se ha observado que tiene un efecto tóxico para las neuronas.

Por otro lado, en la ruta amiloidogénica, la  $\beta$ -secretasa (BACE1) corta a la APP en la región N-terminal del péptido A $\beta$ , lo que produce el péptido soluble sAPP $\beta$ . Dicho péptido se conoce como C99, que se internaliza en endosomas y posteriormente se procesa proteolíticamente por la actividad de  $\gamma$ -secretasa. Esta actividad enzimática corta en la región C-terminal del péptido A $\beta$ , lo que produce el A $\beta_{40/42}$ . Leissring ha sugerido que el fragmento que resta, después del procesamiento por  $\gamma$ -secretasa, también puede ser procesado endocíticamente de una forma lisosomal/endosomal (Leissring, 2002).

En la actividad de  $\gamma$ -secretasa están involucradas cuatro proteínas diferentes: presenilina, nicastrina, APH-1 y PEN-2. El sitio activo de  $\gamma$ -secretasa requiere de la actividad de aspartil-proteasa de PS1. Nicastrina, APH-1 y PEN-2 son componentes importantes de la  $\gamma$ -secretasa y cada uno puede modificar la actividad enzimática de diferentes maneras y en respuesta a estímulos fisiológicos (Yu et al, 2000; Francis et al, 2002; Takasugi et al, 2003).

El corte por la  $\alpha$ -secretasa ocurre dentro del retículo endoplásmico (RE) y en varios compartimentos dentro del aparato de Golgi-trans (Nunan and Small, 2000). También existe actividad de  $\alpha$ -secretasa en la membrana celular (Parvathy, 1999).

Las actividades de  $\alpha$  y  $\beta$ -secretasas (ADAM17, ADAM10 y BACE1,) han sido localizadas en el RE, aparato de Golgi, trans-Golgi y membrana plasmática (Huse et al, 2000). Las presenilinas se localizan principalmente en el RE y aparato de Golgi (Kovacs et al, 1996), aunque han sido detectadas pequeñas cantidades en endosomas y membranas plasmáticas (Xia et al, 1997).

Además, la APP, BACE1 y PS1 han sido localizadas en compartimentos vesiculares axonales en el nervio ciático de ratón (Kamal et al, 2001). La APP se une a kinesina en este compartimento y la vesícula completa es transportada del cuerpo celular hacia el axón. También se ha demostrado la producción del péptido A $\beta$  en estas vesículas.

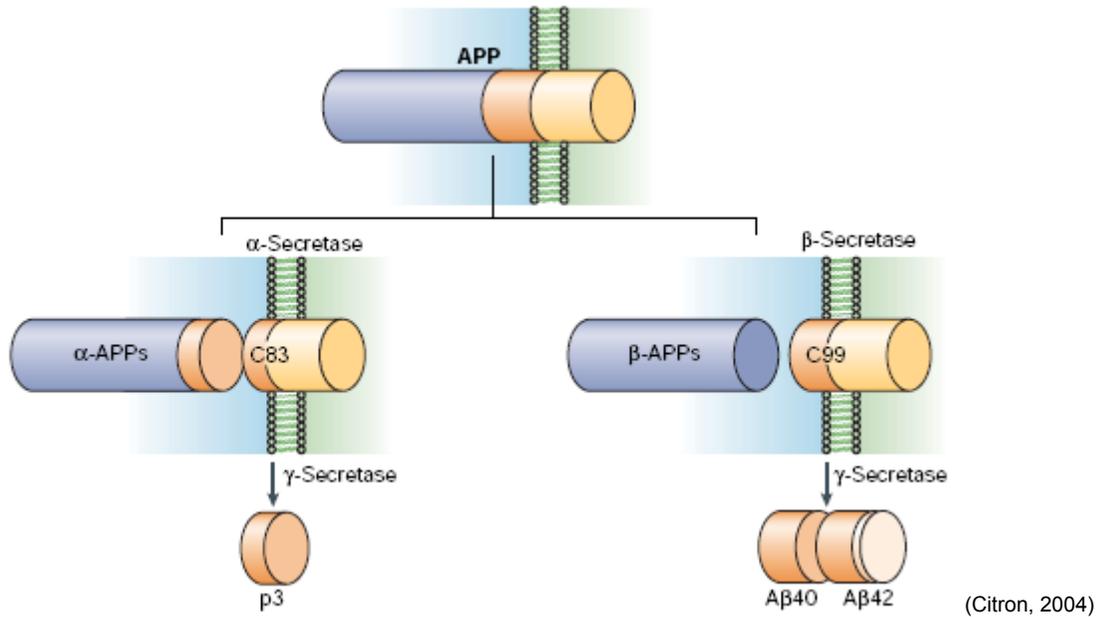


Figura 1. Proteína precursora del amiloide (APP) y sus metabolitos. La proteína transmembranal APP puede ser procesada por dos rutas, la ruta no amiloidogénica y la ruta amiloidogénica. En la ruta no amiloidogénica, la  $\alpha$ -secretasa corta en el centro del péptido A $\beta$  generando un fragmento soluble de la APP ( $\alpha$ -APPs). El péptido de la región C-terminal (C83) es metabolizado hacia P3 por la  $\gamma$ -secretasa. En la ruta amiloidogénica, la  $\beta$ -secretasa corta en el extremo N-terminal del péptido A $\beta$ , generando un fragmento soluble de la APP ( $\beta$ -APPs). El péptido de la región C-terminal (C99) es cortado por la  $\gamma$ -secretasa, lo que genera al péptido A $\beta_{40/42}$ . La  $\gamma$ -secretasa también libera un dominio intracelular de la APP (AICD).

## ESTADOS DE AGREGACIÓN Y NEUROTOXICIDAD DEL PÉPTIDO A $\beta_{42}$

En diferentes enfermedades neurodegenerativas, como la EA, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y las enfermedades por priones, la agregación de distintas proteínas juega un papel fundamental en el desarrollo de la patología. En el caso de la EA, múltiples estudios demuestran que el estado de agregación del péptido A $\beta$ , puede tener diferentes efectos en el SNC.

Yankner y colaboradores (1998) han demostrado que el péptido A $\beta$  tiene propiedades neurotóxicas *in vivo*, cuando es inyectado en el cerebro de primates ancianos (Geula et al, 1998). Este efecto no se presenta en animales jóvenes, lo cual sugiere que la edad es determinante en la vulnerabilidad del cerebro a la neurotoxicidad mediada por el péptido A $\beta$ .

En otros estudios se ha propuesto que la agregación del péptido A $\beta$  *in vivo*, genera procesos inflamatorios en el cerebro (Eikelenboom et al, 1994). Además, se ha observado la activación de la microglía y astrocitos próximos a las placas seniles en cerebros de pacientes con EA. Estos dos tipos celulares son los principales mediadores de inflamación en el SNC, mediante la producción de moléculas

proinflamatorias como: el complemento, citocinas y proteínas de fase aguda. (Kontush et al, 2001).

Además, existen múltiples reportes que indican que los oligómeros del péptido A $\beta$ , a los que también se les denomina ADDLs (ligandos difusibles del péptido  $\beta$ -amiloide), son aun más tóxicos que las fibrillas del péptido A $\beta$ . Los ADDLs son estructuras globulares de 4-6 nm de diámetro que, bajo ciertas condiciones, se forman a partir de péptido A $\beta_{42}$  sintético y no forman fibrillas. La toxicidad mediada por oligómeros del péptido A $\beta$  (ADDLs) fue descrita por Klein y sus colaboradores, ya que observaron que los oligómeros causan muerte neuronal en rebanadas de hipocampo a concentraciones nanomolares (Lambert et al, 1998). La presencia de oligómeros del péptido A $\beta$  en cultivos genera desde disfunción sináptica a nivel de hipocampo y bloqueo de la potenciación a largo plazo (LTP) *in vivo* (Walsh, 2002), hasta la muerte de las células de dicha estructura. El péptido A $\beta$  puede reducir la transmisión sináptica debilitando las sinapsis a través de un mecanismo similar al fenómeno fisiológico de depresión a largo plazo (LTD) (Hsieh et al, 2006). La depresión sináptica mediada por el péptido A $\beta$  puede estar relacionada con p38 (MAPK), lo que lleva a la fosforilación del receptor de glutamato tipo AMPA, en el sitio de fosforilación de éste en la LTD, que resulta en la endocitosis de dicho receptor en el proceso de depresión sináptica. También podrían estar interviniendo otros mecanismos de señalización sináptica, por ejemplo los que involucran al receptor de glutamato tipo NMDA, que implican al péptido A $\beta$  y que resultan en una reducción en la transmisión sináptica excitatoria y en cambios estructurales en las neuronas, como es la pérdida de espinas dendríticas (Yankner y Lu, 2008).

Los ADDLs bloquean la LTP *in vitro* y causan muerte neuronal (Lambert, 1998; Wang 2002). Los ADDLs tienen dimensiones similares a las protofibrillas (Walsh, 1997). Las protofibrillas son intermediarios en la formación de fibrillas del péptido A $\beta$  y, presentan una estructura curva de 4-8 nm de diámetro y 5-200 nm de longitud (Walsh, 1997).

Al igual que las protofibrillas, las fibrillas inducen cambios electrofisiológicos (Hartley, 1999), alteración en el metabolismo normal de las neuronas (Walsh et al, 1999; Ward et al, 2000) y en la viabilidad celular (Hartley et al, 1999). Las fibrillas, con características morfológicas similares a las que se encuentran en placas neuríticas de pacientes con EA, se generan mediante la incubación del péptido A $\beta$  sintético, a pH neutro, a concentraciones  $\geq 20$   $\mu$ M. El péptido A $\beta$  fibrilar tiene un efecto dosis-dependiente en la disminución de la viabilidad neuronal en cultivo, como al ser inyectado en cerebros de primates (Geula et al, 1998). Existen estudios que demuestran que el péptido A $\beta$  fibrilar puede bloquear la LTP *in vivo* (Stephan et al, 2001).

De todos los estudios anteriores podemos decir que diferentes especies del péptido A $\beta$ , pueden perturbar la plasticidad sináptica, es decir, que son especies sinaptotóxicas en diferentes momentos de la enfermedad.

Recientemente, Lesne y colaboradores (2006) postularon que especies no fibrilares de agregados del péptido A $\beta$  (oligómeros) causan deficiencias cognitivas. En modelos murinos de la EA observaron que la administración de anticuerpos anti-A $\beta$  mejora rápidamente los problemas de memoria y que las deficiencias en la memoria aparecen antes que las placas. De esta forma, concluyeron que el incremento en la producción de especies particulares del péptido A $\beta$ , antes de la aparición de placas, es la causa del déficit cognitivo. Ellos denominaron a estas especies hipotéticas como A $\beta$  star (A $\beta^*$ ). Los candidatos para A $\beta^*$  se espera que correlacionen con el déficit cognitivo.

Después de analizar diferentes especies extracelulares del péptido A $\beta$  de extractos de cerebros de ratones, estables en SDS (dodecilsulfato de sodio) en Western blots, se ha observado que estas especies incluyen monómeros, dímeros, trímeros y múltiplos de trímeros, como hexámeros, nonámeros y dodecámeros.

Klyubin y colaboradores (2008) reportaron que dímeros presentes en el líquido cefalorraquídeo humano rápidamente inhiben la potenciación a largo plazo hipocampal *in vivo*. Además, la infusión sistémica de un anticuerpo monoclonal anti-A $\beta$  puede prevenir el trastorno en la plasticidad sináptica.

La presencia de dodecámeros en el SNC presenta una correlación fuerte con los cambios en la memoria, nombrados A $\beta^*$ 56 (por el peso molecular de esta especie). Para demostrar que el A $\beta^*$ 56 es suficiente para causar un déficit en la memoria, esta especie fue purificada usando anticuerpos anti-A $\beta$  y confirmada mediante espectrometría de masa, a partir de cerebros de ratones Tg2576. Esta especie fue inyectada en los ventrículos cerebrales de ratas sanas, previamente entrenadas en la prueba de laberinto de agua de Morris. En comparación con ratas tratadas con el vehículo, las ratas tratadas con el A $\beta^*$ 56 mostraron defectos en la memoria espacial a largo plazo. Esto confirma que la A $\beta^*$ 56 cumple con el criterio de inductor de un déficit cognoscitivo (Lesne et al, 2006).

Los oligómeros producen un déficit rápido y reversible en la memoria. Debido a que es posible generar anticuerpos específicos contra oligómeros, la vacunación puede ser un buen acercamiento para el tratamiento de la EA.

En 1989, Whitson y colaboradores reportaron por primera vez que el péptido A $\beta$  tiene efectos neurotróficos ligeros a concentraciones de nanomolar y en células indiferenciadas. Actualmente, existe evidencia de que monómeros del péptido A $\beta$  no

son tóxicos para las células y en las neuronas protegen del estrés oxidante (Kontush et al, 2001). Más tarde, Yankner y colaboradores (1990) demostraron que el péptido A $\beta$  puede tener propiedades neurotóxicas. La discrepancia de los resultados proviene de las propiedades fisiológicas del péptido A $\beta$ , ya que sus efectos dependen de su estado de agregación. El péptido soluble (disuelto en fresco) promueve la sobrevivencia neuronal, mientras que el péptido que ha “envejecido” por más de 24h (en una forma agregada o fibrilar) muestra propiedades neurotóxicas (Pike et al, 1991). Kamenetz y colaboradores (2003) observaron que el péptido A $\beta$  es secretado por neuronas sanas en respuesta a la actividad, por lo tanto el péptido A $\beta$  podría estar regulando la transmisión sináptica excitadora.

El mecanismo por medio del cual el péptido A $\beta$  agregado causa neurodegeneración *in vitro* no está claro, pero es probable que el efecto se deba a un trastorno en la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> y a la inducción de daño oxidante por radicales libres. Además, el péptido A $\beta$  puede inducir apoptosis o necrosis, dependiendo de la concentración del péptido A $\beta$  y del tipo celular. No existe evidencia clara de que esta toxicidad esté mediada por la unión del péptido A $\beta$  a un receptor de membrana, aunque se ha sugerido que está involucrado “RAGE” (*receptor for advanced glycation end products*) (Yan et al, 1996). Atwood y colaboradores (2003) proponen que la actividad neurotóxica del péptido A $\beta$  *in vitro* se debe a su capacidad de unión a metales con su metionina 35 (secuencia del péptido A $\beta$ <sub>42</sub>: ADAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLM<sub>35</sub>VGGVVIA).

---

## HIPÓTESIS DE LA CASCADA AMILOIDE

La denominada hipótesis de la “cascada amiloide” favorece un modelo de enfermedad en el que diversos factores genéticos (algunos todavía por identificar) dan lugar, directa o indirectamente, a una alteración en la expresión de la APP o en su procesamiento proteolítico o a cambios en la estabilidad o agregación del péptido A $\beta$ . Esto da como resultado un desequilibrio entre la producción y la degradación del péptido A $\beta$ . El aumento del péptido A $\beta$  agregado, A $\beta$ <sub>42</sub> en primer lugar (Jarrett et al, 1993), y más tarde A $\beta$ <sub>40</sub>, pone en marcha una cascada compleja de eventos con activación local de astrocitos y microglía, lo cual conlleva a la liberación de citocinas y proteínas de fase aguda (McGeer et al, 1995). A través de estos cambios inflamatorios o bien a través de la neurotoxicidad directa del péptido A $\beta$ , se produciría una lesión local en neuronas y neuritas que experimentarían profundos cambios metabólicos, incluyendo la fosforilación de tau y formación de filamentos helicoidales apareados (PHF). Asimismo, el péptido A $\beta$  agregado podría inducir alteraciones en la homeostasis del calcio y daño oxidante a través de la formación de radicales libres en

neuronas y glía. El resultado de todos estos acontecimientos es la pérdida de neuronas y elementos sinápticos, dando como resultado el déficit de neurotransmisores y la aparición de los síntomas clínicos de demencia (Selkoe, 1997).

Esta hipótesis ha ganado fuerza y adeptos en los últimos años y continúa siendo objeto de numerosos estudios de investigación.

Uno de los argumentos a favor de esta hipótesis es que todos los genes identificados hasta el momento implicados en la EA son capaces de interferir con el metabolismo de la APP, dando lugar a un aumento en la producción (APP, PS1 y PS2) y/o depósito (APOE  $\epsilon$ 4) del péptido A $\beta$ . Los pacientes con síndrome de Down, que de forma invariable desarrollan los cambios histopatológicos típicos de una EA alrededor de los 50 años de edad, tienen una producción aumentada del péptido A $\beta$  desde su nacimiento y comienzan a desarrollar depósitos difusos amiloides en su cerebro a edades tan tempranas como los 12 años, que preceden a los cambios neuríticos y a la aparición de marañas neurofibrilares (Lemere et al, 1996).

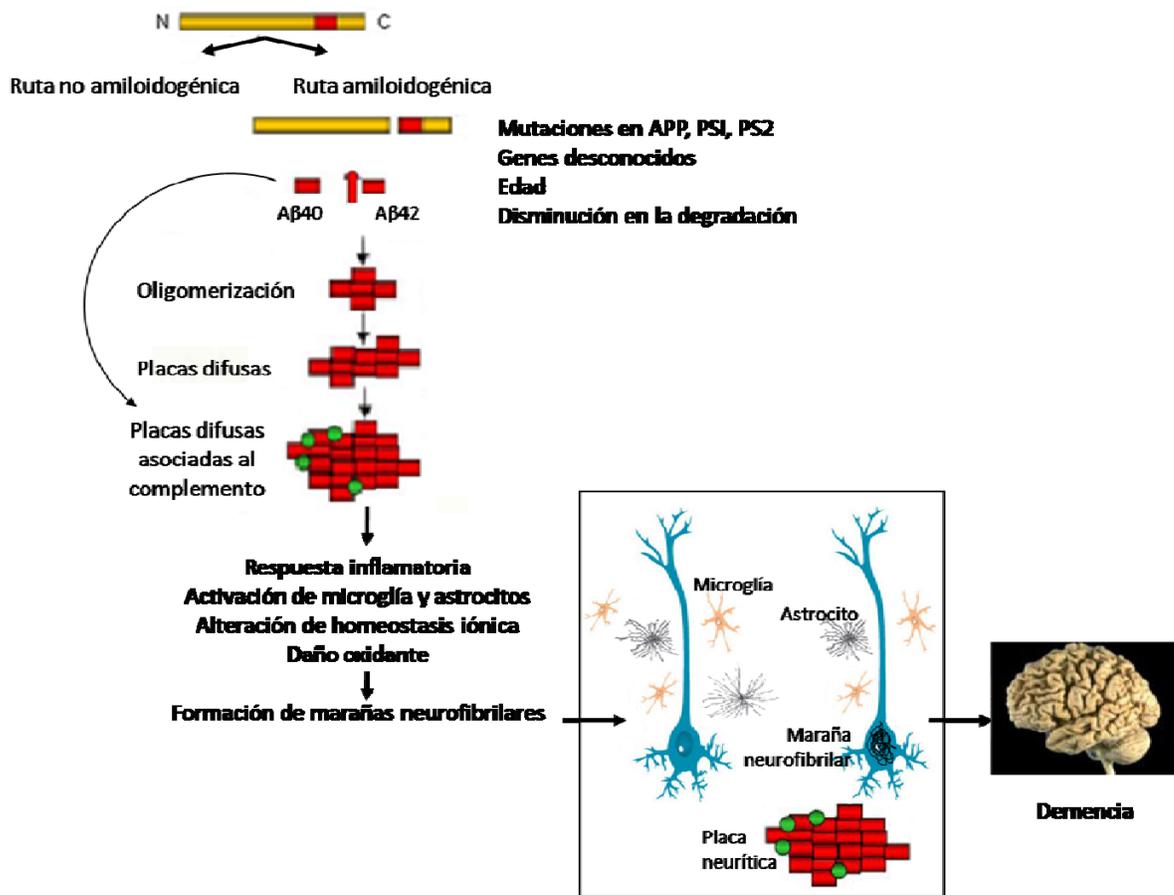
Por otro lado, las mutaciones en el gen que codifica para la proteína tau son la causa de demencia frontotemporal con parkinsonismo y otras taupatías, y no de la EA. Estas enfermedades se caracterizan por el depósito anómalo de tau en forma de marañas neurofibrilares, que típicamente no se acompañan de depósitos de A $\beta$  (Hardy y Selkoe, 2002).

Se ha demostrado en diversas líneas de ratones transgénicos que sobreexpresan la APP humana mutada, que estos modelos desarrollan en primer lugar placas amiloides difusas seguidas de placas que contienen A $\beta$  fibrilar asociadas a daño neurítico y activación de la microglía, cuyas consecuencias clínicas y electrofisiológicas son un déficit progresivo de memoria y aprendizaje, además de la plasticidad sináptica, respectivamente (Gómez-Isla y Irizarri, 2002). En los ratones transgénicos que expresan la APP y tau humanas mutadas en sus cerebros hay una formación significativamente mayor de marañas neurofibrilares, sin cambios significativos en la cantidad del péptido A $\beta$  depositado (Lewis et al, 2001). Esto sugiere que el péptido A $\beta$  tiene una clara influencia en la formación de marañas neurofibrilares en estos animales y, posiblemente, en la EA en humanos.

Además, múltiples trabajos han demostrado que el péptido A $\beta$  fibrilar es tóxico para las neuronas en cultivo y que dicha toxicidad puede prevenirse, al menos en parte, bloqueando la formación de fibrillas del péptido A $\beta$  (Hardy y Selkoe, 2002). Por otro lado, diversos estudios recientes sugieren que más que el propio péptido A $\beta$  fibrilar,

especies intermedias de oligómeros solubles del péptido A $\beta$ , son responsables de la disfunción neuronal y sináptica en la EA (Klein, 2002).

Es muy interesante en este aspecto, la observación de que el contenido de oligómeros del péptido A $\beta$  solubles en el cerebro de pacientes con EA, parece correlacionarse mejor que la cantidad de placas seniles, con la gravedad del cuadro clínico de demencia, por lo cual es importante el desarrollo de terapias enfocadas en inhibir el efecto tóxico de estas especies solubles del péptido A $\beta$ .



(Modificada de Verdile et al, 2004)

Figura 2. Hipótesis de cascada amiloide. Factores ambientales y genéticos (mutaciones en la APP, PS1 y PS2, en genes desconocidos) generan un desequilibrio en el procesamiento de la APP, lo que causa una sobreproducción y acumulación del péptido A $\beta$ <sub>42</sub>, que se deposita y conlleva a la formación de placas difusas. La agregación de otras proteínas, lo que incluye al péptido A $\beta$ <sub>40</sub> y el complemento, da como resultado la formación de las placas neuríticas. La formación de estas placas resulta en la activación de la microglía y astrocitos, daño oxidante y la agregación de tau, lo que conduce a la muerte neuronal y finalmente a la demencia.

## MODELOS TRANSGÉNICOS DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: RATONES TRANSGÉNICOS

Las mutaciones responsables de casos de FAD, están en los genes de la APP, PS1 y PS2. Todas estas mutaciones tienen como resultado una mayor producción del péptido A $\beta$ , lo que confirma que la neurotoxicidad inducida por el péptido A $\beta$  es uno de los primeros eventos moleculares en la patogénesis de la EA (Price and Sisodia, 1998).

Los avances sucesivos en la producción de modelos transgénicos de la EA se han basado en conseguir progresivamente mayores niveles de sobreexpresión de la APP y de favorecer la formación del péptido A $\beta$  más amiloidogénico (el de 42 aminoácidos). Así se han conseguido múltiples líneas de ratones con depósitos del péptido A $\beta$  en forma de placas como las que se encuentran en la EA y que reproducen características de la enfermedad.

Un modelo experimental de ratón que recapitule todos los aspectos de la EA no ha sido generado hasta la fecha, situación que revela limitaciones al utilizar un roedor para reproducir una enfermedad de humano, que se desarrolla durante décadas y que además involucra funciones mentales superiores (ver tabla 1).

MODELOS TRANSGÉNICOS DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: RATONES TRANSGÉNICOS	
MODELO	DESCRIPCIÓN
PDAPP	Primer modelo de ratón transgénico con abundantes placas (Games et al, 1995). Los ratones expresan la forma cDNA humana de la mutación Indiana (APP <sub>V717F</sub> ) con porciones de los intrones APP 6-8. Este modelo se ha empleado extensamente en terapias basadas en la inmunización. Desde la edad de 6 meses, los ratones heterocigotos desarrollan depósitos visibles extracelulares de péptido A $\beta$ en el hipocampo, y a los 8 meses en la corteza (Games et al, 1995 (2)). Presentan algunos depósitos amiloides (Rojo Congo y tioflavina S positivos). El péptido A $\beta$ se encuentra también en las paredes vasculares.
Tg2576	Ratones mutantes que expresan APP <sub>SWE</sub> (la isoforma 695 de hAPP con la doble mutación Sueca-K670N/M671L) bajo el control de un prión de promotor de hámster (Hsiao et al, 1996). Es uno de los modelos transgénicos más empleados. A los 9-11 meses de edad aparecen depósitos amiloides difusos y focales en los animales heterocigotos.

<b>MODELOS TRANSGÉNICOS DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: RATONES TRANSGÉNICOS</b>	
<b>MODELO</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
<b>APP23</b>	Ratones que expresan la mutación APP <sub>SWE</sub> bajo el control del promotor Thy1 (Sturchler-Pierrat et al, 1997). Existen depósitos congófilos difusos del péptido Aβ en el parénquima y los vasos en ratones de 6 meses de edad.
<b>TgCRND8</b>	Ratones que expresan múltiples mutaciones de la APP (Sueca e Indiana-hAPP695 K670N, M671L + V717F) bajo el promotor que es un prion de hámster (Janus et al, 2000). Desarrolla placas a los 3 meses de edad. La elevada concentración de péptido Aβ y la relación alta de Aβ <sub>42</sub> /Aβ <sub>40</sub> explica porqué este modelo es particularmente agresivo.
<b>PSEN1<sub>M146V</sub> o PSEN1<sub>M146M</sub></b>	Estos modelos fueron la primera demostración <i>in vivo</i> que la PS1 mutada eleva selectivamente el péptido Aβ <sub>42</sub> (Duff et al, 1996).
<b>PSAPP</b>	Tg2576xPSEN1 <sub>M146L</sub> (Holcomb et al, 1998), PSEN1-A246E+ APP <sub>SWE</sub> (Borchelt et al, 1997). Ratones transgénicos bigénicos. El añadir el transgen mutado de PS1 acelera marcadamente la patología amiloide.
<b>hAPP H6, J9 y J20 hAPP</b>	Existen varias líneas de ratones transgénicos que expresan, a varios niveles, la forma silvestre ( <i>wild-type</i> ), o la mutada hAPP bajo el promotor PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas, Mucke et al, 2000). Las líneas J9 y J20 al igual que Tg CRND8 expresan hAPP con la mutación Sueca e Indiana. En estas líneas, el transgene humano es la isoforma 770. La línea J9 (hAPP <sub>low</sub> ) expresa un moderado nivel de la APP neuronal y de Aβ. El nivel de expression es mayor en la línea J20 (Chin et al, 2005). La línea H6 también expresa la hAPP con la mutación Indiana bajo el control del promotor PDGF (Wyss-Coray et al, 2002).
<b>APP<sub>Dutch</sub></b>	Ratones que expresan la APP con la mutación Danesa que produce hemorragia cerebral con depósito amiloide tipo Danés en humanos. Estos ratones producen angiopatía amiloide congófila severa (Herzig et al, 2004). La mutación E693Q de la APP induce a una angiopatía amiloide masiva, como lo descrito en pacientes Daneses. La enfermedad ha sido replicada generando una línea de ratón que expresa hAPP751 con la mutación E693Q bajo el promotor Thy1.2
<b>ARC6 y ARC48</b>	La mutación Ártica (E22G) se localiza en la secuencia del péptido Aβ. Estimula la fibrilización del péptido Aβ sin cambios en la relación Aβ <sub>42</sub> /Aβ <sub>40</sub> (Cheng et al, 2004).

<b>MODELOS TRANSGÉNICOS DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: RATONES TRANSGÉNICOS</b>	
<b>MODELO</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
BRI-AB <sub>40</sub> o BRI-AB <sub>42</sub>	Ratones que expresan isoformas del péptido A $\beta$ sin sobreexpresión de la APP (McGowan et al, 2005).
JNPL3	Ratones que expresan 4RON MAPT con la mutación P301L (Zhang et al, 2004). Fue el primer modelo transgénico, con un marcado depósito de marañas neurofibrilares y pérdida celular, demostrando que MAPT puede producir daño celular.
Tau <sub>P301S</sub>	Ratones transgénicos que expresan la isoforma más corta de 4R MAPT con la mutación P301S (Allen et al, 2002).
Tau <sub>V337M</sub>	La síntesis de bajos niveles de 4R MAPT con la mutación V337M dirigido por el promotor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) (Tanemura et al, 2001).
Tau <sub>R406W</sub>	Ratones que expresan 4R MAPT humana con la mutación R406W bajo el control del promotor CAMKII (Tatebayashi et al, 2002).
rTg4510	Ratones transgénicos con MAPT inducible utilizando el sistema TET-off (Ramsden et al, 2005).
Htau	Ratones transgénicos que expresan la MAPT humana exclusivamente (ratón knocked-out para MAPT) (Andorfer et al, 2003).
TAPP	Tg2576Xjnl3. Incrementa la neuropatología MAPT en ratones TAPP comparado con JNPL3, lo que sugiere que la APP mutada y/o el péptido A $\beta$ pueden afectar a la propagación de la patología MAPT (Lewis et al, 2001).
3xTgAD	Triple modelo transgénico que expresa la APPSWE, MAPT301L en un ratón Knock-in para PSEN1M146L (PSEN1-KI) (Oddo et al, 2003).

Tabla 1. Modelos transgénicos de la EA.

Muchos grupos de investigación utilizan diferentes especies para el estudio de la EA, como *Drosophila melanogaster* y *Ceanorhabditis elegans*, que han sido herramientas para el estudio de cascadas biológicas involucradas en la enfermedad de forma muy

rápida y a bajo costo (Gunawardena y Goldstein, 2001; Link, 1995). También existen estudios que se han realizado en conejos, caninos y primates, pero desafortunadamente en la actualidad no existe ningún modelo experimental que resuma todos los aspectos de la EA.

## ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La hipótesis amiloide señala que el incremento en la producción y la acumulación del péptido A $\beta$ <sub>42</sub> es la causa de la patogénesis de la EA. Con base en esta hipótesis se han diseñado varias estrategias terapéuticas que consideran al péptido A $\beta$ <sub>42</sub> como un blanco terapéutico. De manera que las investigaciones están orientadas: 1) a la modulación de las enzimas involucradas en la producción del péptido A $\beta$  (Hardy y Selkoe, 2002), promoviendo la vía no amiloidogénica a través de la  $\alpha$ -secretasa, o bien inhibiendo la  $\beta$  o  $\gamma$ -secretasas (Dewachter y Leuven, 2002), y 2) en la inhibición de la agregación de este péptido, al evitar la oligomerización del péptido A $\beta$  y eliminarlo del cerebro (objetivo de la inmunoterapia) (Dodel et al, 2003).

### INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DEL PÉPTIDO $\beta$ -AMILOIDE

Las secretasas son un grupo variado de proteinasas que son candidatos para ser manipuladas para la modulación del procesamiento anómalo de la APP en la EA (Dewachter y Leuven, 2002). Para la  $\alpha$ -secretasa se busca la manera de estimularla y promover la ruta no amiloidogénica del metabolismo de la APP; aunque en la actualidad se sabe que esta ruta genera al péptido p3, que es un péptido truncado del péptido A $\beta$ , que también es tóxico y se encuentra presente en cerebros de pacientes con la EA.

Por otro lado, se pretende inhibir la  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasas, responsables de la vía amiloidogénica (Ghosh et al, 2002). Estas denominaciones genéricas con letras griegas persisten, a pesar de que la *alfa* se ha identificado ya como ADAM 9, ADAM10 y ADAM 17, la *beta* como BACE1 y la *gamma* como un complejo formado por presenilina1, APH-1, PEN-2, nicastrina (Drewes, 2003).

Existen estudios enfocados a inhibir la  $\beta$ -secretasa, una proteasa transmembranal que se encuentra en todas las células, pero en mayor cantidad en neuronas. Estudios en ratones knockout de la  $\beta$ -secretasa han mostrado que la falta de la  $\beta$ -secretasa provoca alteraciones morfológicas; además, se le ha atribuido un papel en la liberación de neurotransmisores (Citron, 2004) y en la mielinización del SNC y periférico.

El primer problema al tratar de inhibir la actividad de BACE1 es que el inhibidor pase la barrera hematoencefálica. El segundo es que ha de actuar sólo sobre BACE1 y respetar BACE2, que es muy importante para la vascularización (Dewachter y Leuven, 2002).

El incremento en la producción del péptido A $\beta$  depende de varios factores que influyen en la estructura del complejo de  $\gamma$ -secretasa. Entre estos factores se encuentran la composición de lípidos en la membrana celular y la cantidad de inhibidores de esta enzima. Estos datos son de importancia para el desarrollo de agentes terapéuticos. Sin embargo también se sabe que las presenilinas tienen otras funciones en el SNC, como por ejemplo, la eliminación de proteínas de desecho y la activación de vías de señalización que inhiben la fosforilación de tau. Además, otro sustrato conocido de la  $\gamma$ -secretasa es Notch, que tiene funciones importantes en el sistema nervioso. Todo esto indica que si se piensa en la  $\gamma$ -secretasa como un blanco terapéutico, es necesario un mayor conocimiento del que se tiene acerca del funcionamiento de este complejo y de sus componentes. En estudios clínicos Fase II se ha demostrado que la inhibición de la  $\gamma$ -secretasa provoca una disminución en la concentración del péptido A $\beta$  en el plasma, pero no en líquido cefalorraquídeo (Citron, 2004).

---

## **INMUNOTERAPIA EN MODELOS ANIMALES**

---

### **INMUNIZACIÓN ACTIVA**

El primer reporte de los beneficios de la inmunoterapia con el péptido A $\beta$ , en donde se observó una reducción de los efectos que producen las placas amiloides, fue el de Schenk y colaboradores en 1999 (Schenk et al, 1999). Estos investigadores usaron un modelo de ratón transgénico (PDAPP) que sobreexpresa la APP humano con la mutación V717F relacionada con la FAD, junto con el promotor del factor de crecimiento  $\beta$  derivado de plaquetas. Los ratones PDAPP heterocigotos desarrollan depósitos del péptido A $\beta$  como las placas seniles entre los 6 y 9 meses de edad en el hipocampo, corteza cerebral y cuerpo calloso. Sin embargo las marañas neurofibrilares no se presentan en este modelo animal. Las placas de A $\beta$  en estos ratones están asociadas a neuritas distróficas, una característica de estados tempranos o preclínicos de la EA. Los ratones PDAPP también presentan déficit en el aprendizaje dependiente de la edad evaluada en una versión modificada del laberinto de agua de Morris, que evalúa la memoria espacial reciente. Estos investigadores reportaron que la inmunización de los ratones PDAPP con el péptido A $\beta_{42}$  humano de animales jóvenes, esencialmente previene el desarrollo de placas de A $\beta$ , neuritas distróficas y astrogliosis. El tratamiento de ratones transgénicos viejos también

presenta una reducción marcada en la extensión y progresión de estas neuropatologías como la EA.

Janus y colaboradores (2000) investigaron otro modelo de ratón transgénico que contiene el  $\beta$ APP<sub>695</sub> humano con las mutaciones relacionadas con la FAD (K670N/M671L y V717F). En este modelo, los ratones desarrollaron placas del péptido A $\beta$  en una edad temprana (aproximadamente 3 meses) y también demostraron un déficit en el desarrollo del laberinto de agua de Morris. La inmunización con el péptido A $\beta$ <sub>42</sub> redujo aproximadamente en un 50% las placas con centro denso a la edad de 25 semanas y se presentó una mejora significativa en el trabajo de memoria espacial. Este estudio muestra que la inmunización con el péptido A $\beta$  puede reducir la formación de placas y disminuir las pérdidas cognitivas (Janus et al, 2000). Es interesante que la inhibición de la formación de estas placas no esté asociada a la reducción de los niveles del péptido A $\beta$  en el cerebro de estos animales.

Morgan et al, (2000) emplearon la misma estrategia de inmunización con el péptido A $\beta$ <sub>42</sub> en ratones transgénicos APP/PS1 de 7.5 meses de edad. Estos ratones fueron resultado de la reproducción de ratones transgénicos Tg2576 con una mutación del APP humano y con la línea 5.1 de ratones transgénicos con mutaciones en el gen de PS1. Se observó una modesta reducción de las placas en ratones de 15 a 16 meses de edad. En cambio, los ratones presentaron una mejora en el desarrollo de las tareas de memoria (Morgan et al, 2000). Este reporte contrasta con estudios con ratones PDAPP que indican que la carga de placas amiloides explica el daño cognitivo (Chen et al, 2001) y que la reducción de la formación de estas placas debida a la inmunización con el péptido A $\beta$ <sub>42</sub>, está asociada con una mejora en el desarrollo de tareas similares de memoria espacial (Janus et al, 2000).

Existe preocupación en el uso de especies del péptido A $\beta$  como agentes para la inmunización, por la posibilidad de que estas especies puedan formar fibrillas tóxicas y/o puedan ser semillas para la formación de filamentos amiloides que se depositen en las placas. Para superar esta posibilidad, algunos investigadores están explorando estrategias alternativas con inmunógenos no amiloidogénicos del péptido A $\beta$ . Sigurdsson et al, (2001) utilizaron una construcción para una nueva forma de inmunización con K6A $\beta$ 1-30NH<sub>2</sub>, que mantiene los residuos 1-30 del péptido A $\beta$  más 6 residuos de lisina en el extremo N-terminal para promover la inmunogenicidad. La inmunización con esta construcción del péptido A $\beta$  de ratones transgénicos Tg2576 por 7 meses, reduce la carga amiloide en la corteza cerebral y el hipocampo en un 89% y 81%, respectivamente. Simultáneamente, se encontró una reducción del 57% en el nivel del péptido A $\beta$  soluble en el cerebro y una ausencia de marcadores de inflamación asociados a las placas en estos animales (Sigurdsson et al, 2001). Este

estudio indica que no son necesarias estrategias de inmunización con especies insolubles del péptido A $\beta$  para reducir los depósitos de las placas o los niveles de A $\beta$ <sub>42</sub> solubles en el cerebro.

---

## INMUNIZACIÓN PASIVA

En un estudio en ratones transgénicos PDAPP, Bard y colaboradores (2000), demostraron que anticuerpos monoclonales y policlonales contra el péptido A $\beta$ , administrados periféricamente, entran al SNC y reducen las placas en un 93% y 81% respectivamente, junto con la reducción de la patología en este modelo murino de la EA (Bard et al, 2000). Estos resultados indican que, en ausencia de inmunidad celular, los anticuerpos son suficientes para disminuir la acumulación de agregados del péptido A $\beta$  y la patología tipo EA.

En un estudio subsiguiente, DeMattos y colaboradores (2001) mostraron que la administración periférica crónica de un anticuerpo monoclonal m266 (anti-A $\beta$ <sub>13-28</sub>), dirigido contra el dominio central del péptido A $\beta$ <sub>42</sub>, en ratones transgénicos PDAPP, reduce marcadamente la acumulación de agregados del péptido A $\beta$ , aunque m266 no se une a los depósitos de A $\beta$  en el cerebro (DeMattos et al, 2001). Estos resultados sugieren, que ciertos anticuerpos anti-A $\beta$  pueden suprimir la patología tipo EA, al alterar el equilibrio del péptido A $\beta$  del SNC y el plasma.

Posteriormente, Bacskai y colaboradores (2002) reportaron que la administración directa de cualquiera de dos anticuerpos, IgG1 anti-A $\beta$ <sub>1-16</sub> (10d5) o IgG2b anti-A $\beta$ <sub>1-5</sub> (3d6), en el cerebro de ratones transgénicos de 18 meses de edad (Tg2576) o de 20 meses de edad (PDAPP), reduce en tres días un 50% los depósitos amiloides difusos en ambos modelos animales. Sorprendentemente, un fragmento F(ab')<sub>2</sub> (que carece de la región Fc del anticuerpo), proveniente del anticuerpo monoclonal (3d6), condujo a la eliminación del 45% de los depósitos amiloides en estos animales, de manera similar a los resultados obtenidos con el anticuerpo completo (Bacskai et al, 2002).

Existen reportes sobre la existencia de epítomos conformacionales en el péptido A $\beta$ , que están involucrados en la formación de fibrillas (Gaskin et al, 1993; Pike et al, 1995; Ma y Nussinov, 2002). Por lo que los anticuerpos dirigidos contra estas regiones podrían ser de gran interés para el tratamiento de la EA. Dodart y colaboradores (2002) han demostrado que la administración pasiva de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la región central del péptido A $\beta$  (m266 (anti-A $\beta$ <sub>13-28</sub>)), que únicamente se une a las formas solubles del péptido, revierte el déficit de la memoria en tareas de reconocimiento de objetos y de aprendizaje en agujero-hospedaje en ratones PDAPP.

Esto sugiere que la inmunoterapia puede actuar a través de la remoción de placas y la neutralización de especies neuroactivas del péptido A $\beta$  (Dodart et al, 2002).

Recientemente, Wilcock y colaboradores (2003) demostraron que la administración intracraneal de IgG1 anti-A $\beta_{1-16}$  y anticuerpos anti-A $\beta$  en ratones Tg2576, provoca una reducción de la carga del péptido A $\beta$  después de 4-24 hrs. y que se mantiene durante 3 a 7 días; además de la activación de la microglía 3 días después de la administración central (Wilcock et al, 2003). Estos investigadores demostraron dos mecanismos de eliminación de placas mediados por anticuerpos anti-A $\beta$ . El primero corresponde a una fase relativamente rápida (en tiempo) e involucra la eliminación del péptido A $\beta$  difuso sin activación de la microglía; el segundo que es más lento, involucra la eliminación del péptido A $\beta$  compacto a través de la activación de la microglía por receptores Fc y fagocitosis de placas preexistentes.

Aunque los estudios anteriores han sugerido que la inmunoterapia con el péptido A $\beta$  activa o pasiva, protege contra el déficit cognitivo en varias líneas de ratones transgénicos, estos estudios se basan prácticamente en los resultados obtenidos en una sola prueba. Debido a que la EA afecta a múltiples dominios cognitivos, Jensen y colaboradores (2005) emplearon una batería de pruebas de comportamiento muy extensa a largo plazo y un análisis multimérico para determinar el impacto de la inmunización con el péptido A $\beta$  a lo largo de la vida adulta de ratones transgénicos APP + PS1 (de 2 a 16.5 meses de edad). Los resultados mostraron que la inmunoterapia con el péptido A $\beta$  protege parcial o completamente a los ratones transgénicos APP + PS1, contra el daño en la ejecución de pruebas de: referencia de aprendizaje/memoria, memoria de trabajo y búsqueda/reconocimiento. La protección que se refleja en el comportamiento, evaluado en pruebas con una duración de meses, no disminuyó los depósitos del péptido A $\beta$  en el cerebro, por lo que el mecanismo de acción de la inmunoterapia con el péptido A $\beta$  que proponen estos investigadores, involucra la neutralización/eliminación de pequeños oligómeros del péptido A $\beta$  del cerebro.

Retomando los datos anteriores y considerando otros existentes que apuntan a la posibilidad de interferir en la toxicidad del péptido A $\beta$  en la EA, el enfoque inmunológico es una herramienta poderosa de trabajo para la posterior evaluación de eventos neuropatológicos y la intervención terapéutica y/o prevención de la EA.

---

## INMUNOTERAPIA EN HUMANOS

Debido al éxito de la vacunación con el péptido A $\beta$  en diferentes especies, se iniciaron pruebas clínicas con una forma sintética del péptido A $\beta$ <sub>42</sub>, al que se le denominó AN 1792. Este péptido, más el adyuvante QS-21, fueron evaluados en pruebas clínicas para un posible uso en el tratamiento de la EA, con la idea de estimular la respuesta inmune contra el péptido.

En las pruebas clínicas de Fase II, 300 pacientes recibieron el tratamiento con AN 1792. Las mediciones de eficacia del tratamiento incluyeron evaluación de la función cognitiva, el volumen del cerebro, concentración de biomarcadores y el funcionamiento día con día. Desafortunadamente, fueron reportados signos y síntomas de meningoencefalitis en un pequeño porcentaje de pacientes (17 casos), los cuales recibieron de una a tres dosis de AN 1792 y todo el estudio fue suspendido en enero del 2002 (Munch and Robinson, 2002). Los síntomas, la duración y la gravedad de la meningoencefalitis fueron considerablemente variables en los pacientes afectados.

La evidencia disponible indica que la vacuna AN 1792 aumenta la producción de anticuerpos anti-A $\beta$  en el suero de pacientes con la EA. Sin embargo, esta terapia no disminuyó notablemente el declive cognitivo. Además, los títulos de anticuerpos producidos por los pacientes mostraron gran variabilidad individual. La heterogeneidad genética de estos pacientes, la condición individual, combinado con la resistencia adquirida de sus células T para generar anticuerpos contra el péptido A $\beta$ , probablemente contribuyó a la variabilidad en el título de anticuerpos. Estos síntomas no están ligados al título de anticuerpos, pero pueden estar relacionado a la infiltración al cerebro de anticuerpos y/o células T (Senior, 2002).

El hecho es que los humanos responden de forma diferente que los ratones transgénicos, por lo que se necesitan hacer más estudios con otras especies, debido a que el modelo murino es insuficiente. En particular, los depósitos del péptido A $\beta$  en ratones transgénicos tienen una composición química diferente, ya que son mucho más solubles que en los humanos. Por lo tanto, las consecuencias de la vacunación son diferentes. La vacunación de ratones transgénicos remueven el A $\beta$  humano de su limitada distribución dejando el péptido A $\beta$  endógeno intacto, mientras que en humanos la respuesta inmune está dirigida contra un blanco endógeno que ocurre naturalmente y que está presente en tejido sano. Por lo que se recomienda que en estudios futuros en animales, se considere inmunizar con el A $\beta$  nativo.

La inmunización pasiva de anticuerpos anti-A $\beta$ , así como la inmunización activa basada en construcciones truncadas del péptido A $\beta$ , como el caso de Sigurdsson y

colaboradores (2001), han sido exitosas en ratones transgénicos y pudieran ser alternativas seguras para el tratamiento de la EA, más que la vacuna AN 1792. La lección más importante que dejaron las pruebas clínicas con AN 1792, es que se tienen que hacer mucho más pruebas en especies no murinas antes de ser evaluadas en humanos. Existen otras especies como osos, perros y primates que desarrollan placas amiloides, aunque no las marañas neurofibrilares y una línea de ratones transgénicos que desarrollan ambos componentes; estas especies pudieran ser buenos modelos para estos estudios.

---

## **MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI $\beta$ -AMILOIDE**

Actualmente, considerando la información generada por diferentes estudios donde se emplearon anticuerpos completos, así como fragmentos de anticuerpos (en estudios *in vitro* e *in vivo*), se han propuesto tres mecanismos de acción de los anticuerpos anti-A $\beta$ , que a continuación se describen.

- 1) Desagregación directa:** Se refiere al efecto directo del anticuerpo sobre el péptido A $\beta$  fibrilar, permitiendo la disolución de las fibrillas. Este mecanismo se basa en estudios en donde los anticuerpos dirigidos a la región EFRH del péptido A $\beta$ , presentan una capacidad de desagregación de fibrillas, *in vitro* (Solomon et al, 1997; Frenkel et al, 1999).
- 2) Activación de microglía y fagocitosis de complejos inmunes:** En este mecanismo se requiere de la región Fc del anticuerpo. Se ha observado que los anticuerpos se unen directamente a los depósitos amiloides y, mediante la región Fc, activan a la microglía para que fagociten al complejo A $\beta$ -anticuerpo (Bard et al, 2000; Bacskai et al, 2002; Schenk et al, 1999; Wilcock et al, 2003).
- 3) “Peripheral sink”:** Este mecanismo se refiere al secuestro del péptido A $\beta$  circulante, causando una migración del A $\beta$ , del cerebro al plasma. Este mecanismo fue propuesto por DeMattos y colaboradores (2001) cuando observaron una disminución en la deposición de las placas sin que el anticuerpo atravesara la barrera hematoencefálica. Otro estudio que apoya este mecanismo es el de Sigurdsson y colaboradores (2001), en donde se observó una disminución de la formación de placas amiloides y del daño cognitivo, pero en este estudio los anticuerpos que se generaron fueron IgM, anticuerpos que se sabe no atraviesan la barrera hematoencefálica.

## TECNOLOGÍA DE PHAGE DISPLAY (DESPLIEGUE EN FAGOS FILAMENTOSOS)

La tecnología de despliegue en fagos o “phage display” (PhD) es una tecnología molecular que permite la expresión de péptidos y proteínas en la superficie de fagos filamentosos. El despliegue en fagos tiene su origen en la década de los 80’s y consiste en la inserción de secuencias de DNA de las moléculas de interés, en el genoma de un bacteriófago filamentosos, para ser expresadas como productos de fusión en alguna de las proteínas de la cubierta del fago, lo cual favorece la presentación de bibliotecas de péptidos o de proteínas en la superficie del virus (Azzazy y Highsmith, 2002).

Esta técnica facilita la identificación para el mapeo de diversos epítomos y mimótopos de epítomos lineales o conformacionales con base en la naturaleza de unión antígeno-anticuerpo. La selección de péptidos, proteínas o anticuerpos se lleva a cabo con alta afinidad y especificidad, por lo que es posible hacer uso del despliegue en fagos para identificar moléculas útiles para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico (Sidhu, 2001).

---

### BACTERIOFAGO M13

Los bacteriófagos son virus que infectan una gran cantidad de bacterias Gram-negativas mediante el pilli. Entre los bacteriófagos filamentosos más conocidos y que infectan específicamente a la bacteria *Escherichia coli* destacan: M13, F1 y Fd.

El bacteriófago M13 es uno de los más estudiados. Este es un fago de 6.5 nm de diámetro y aproximadamente 930 nm de largo. Sin embargo la longitud del fago depende del tamaño de su genoma. El fago M13 contiene como genoma una sola hebra de DNA circular de cadena sencilla de 6.4 kb, conformado por 11 genes. Un fago viable expresa 2700 copias del gen 8 (g8) que codifica para la proteína principal de la cápside del fago, la proteína pVIII. El gen 3 (g3) codifica para la proteína de reconocimiento del pilli, pIII, que es una de las cuatro proteínas menores que forman al fago, presente de 3 a 5 copias. Otros tres genes que codifican a las tres proteínas menores del fago son g6, g7 y g9. Las proteínas menores del fago se encuentran en los extremos del fago, pIII y pVI se encuentran en un extremo y pVII y pIX en el otro (Marvin, 1998).

Dos de las proteínas de cubierta que se utilizan frecuentemente para el despliegue de péptidos, proteínas o fragmentos de anticuerpos son: pIII (340 aminoácidos), expresada de 3 a 5 copias en uno de los extremos del fago y pVIII (50 aminoácidos),

que cuenta con 2700 copias. El grado de expresión de las dos proteínas mencionadas anteriormente constituye una diferencia importante para llevar a cabo la selección de uniones de alta o baja afinidad (Santamaría, 2003).

La infección de M13, es una infección no lítica, es decir no mata ni lisa a los hospederos. Se inicia por la infección, en la cual la proteína pIII reconoce como receptor el pilli F de la bacteria. Después de la infección la cadena de DNA circular se convierte a una forma replicante de DNA de doble cadena (FR). Esta FR se replica por el mecanismo de círculo rodante, generando cadenas sencillas de DNA que sirven como templado, que posteriormente se convierten en FR. Varias copias de la cadena sencilla de DNA son sintetizadas, empaquetadas y finalmente la progenie viral es liberada de la bacteria en forma infectiva (Azzazy et al, 2002).

---

## **BIBLIOTECAS DE ANTICUERPOS DESPLEGADOS EN FAGOS FILAMENTOSOS**

Las bibliotecas de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden ser de dos tipos: inmunes y no inmunes (*naïve*). La biblioteca no inmune se genera a partir de rearrreglos de genes que provienen de un organismo como el humano, el ratón, etc. no inmunizado con el antígeno en cuestión. Las bibliotecas inmunes son creadas de rearrreglos de genes V, que provienen de un organismo inmunizado con el antígeno de interés.

Las bibliotecas de anticuerpos se enriquecen en clonas específicas para un antígeno mediante un procedimiento conocido como bioselección (*biopanning*). En este procedimiento los fagos que tienen desplegados a los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos se ponen en contacto con el antígeno de interés. Los fagos que despliegan en su superficie anticuerpos que no se unen a dicho antígeno se eliminan a través de lavados. Los fagos que despliegan en su superficie anticuerpos que reconocen al antígeno son eluidos o recuperados mediante condiciones que desfavorecen la interacción del antígeno con el fragmento de anticuerpo desplegado en el fago. La condición más utilizada es el cambio de pH. Esta selección generalmente se repite de 2 a 4 rondas (Bradbury et al, 2004).

## VENTAJAS DE LA TECNOLOGÍA DE PHAGE DISPLAY (DESPLIEGUE EN FAGO)

Hasta ahora, la producción de anticuerpos era limitada, en cuanto a tiempo y esfuerzo, por los procesos involucrados en la inmunización de animales y la generación de hibridomas. La tecnología de DNA recombinante y de amplificación génica, ha permitido la clonación de genes de anticuerpos en bacterias. Esto permite producir anticuerpos de forma rápida, así como la manipulación genética de su estructura. La tecnología de PhD permite desplegar fragmentos de anticuerpos como proteínas de fusión en la superficie de fagos filamentosos. El anticuerpo recombinante desplegado en fago retiene su capacidad de unión al antígeno, por lo cual es posible el enriquecimiento de fagos recombinantes que expresen anticuerpos específicos por afinidad. Mediante este acercamiento, anticuerpos con especificidad y afinidad determinadas, pueden ser seleccionados de una población de anticuerpos.

La tecnología de anticuerpos recombinantes por PhD, tiene el poder y versatilidad de imitar las características de la diversidad y selección inmune. Mediante esta tecnología se pueden producir cantidades ilimitadas de anticuerpos para prácticamente cualquier antígeno, a un menor costo.

En general, los anticuerpos recombinantes desplegados en fagos presentan varias ventajas:

- Pueden ser clonados y seleccionados fácilmente.
- No se requiere de una producción a larga escala de animales o cultivos celulares.
- Ofrecen una fuente genética estable.
- Pueden ser genéticamente manipulados, es decir, pueden ser mutados para mejorar la unión con su antígeno.

Los anticuerpos recombinantes solubles tienen ventajas adicionales:

- Se pueden producir de forma rápida y económica.
- Son útiles como reactivos inmunológicos.

Para la EA es de gran interés la generación de fragmentos de anticuerpos (scFv y VH) que puedan actuar extracelular e intracelularmente (*intrabodies*). Estos scFv pueden prevenir la formación de agregados del péptido A $\beta$ , disolver fibrillas preexistentes, protofibrillas u oligómeros, así como, en el caso de *intrabodies*, unirse a depósitos del péptido A $\beta$ <sub>42</sub> intraneuronal. Es importante mencionar que estudios recientes demostraron una acumulación temprana del péptido A $\beta$ <sub>42</sub> intraneuronal y la presencia

de dímeros estables de este péptido en cultivos neuronales, antes de su liberación al medio (Selkoe, 2001; Gouras et al, 2000). Estas observaciones enfatizan el efecto potencial terapéutico de la internalización de anticuerpos para la prevención de la agregación intraneuronal del A $\beta$ <sub>42</sub> para el tratamiento de la EA.

En cuanto a la inmunización pasiva, una de las ventajas de la generación de scFv y VH es la ausencia de una respuesta inmune celular no deseada que se genera por la inmunización activa con el péptido A $\beta$ . Además, la eliminación de complejos A $\beta$ <sub>42</sub>-scFv o VH *in vivo* no activaría a la microglía, como en el caso del anticuerpo completo, que resulta ser una fuente adicional de inflamación en pacientes con EA.

Se ha demostrado con anterioridad que la administración intranasal de un scFv anti-A $\beta$ <sub>42</sub> desplegado en fago filamentoso, reconoce los depósitos del péptido A $\beta$  en el cerebro de ratones transgénicos vivos (Frenkel y Solomon, 2002). Se realizaron estudios histológicos del cerebro de estos animales y no se observaron efectos tóxicos después de la administración de los fagos.

---

#### DESVENTAJAS DE LA TECNOLOGÍA DE PHAGE DISPLAY (DESPLIEGUE EN FAGO)

Actualmente no es posible la utilización de fragmentos de anticuerpos (por ejemplo scFv o VH anti-A $\beta$ ) por despliegue en fago, para el tratamiento de pacientes con EA. Para esto se requiere la generación de fragmentos de anticuerpos recombinantes de manera soluble, eliminando los fagos filamentosos, aunque estos anticuerpos pueden ser menos estables.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

La hipótesis amiloide señala que la causa de la patogénesis de la EA, es el desequilibrio entre la producción y la degradación del péptido A $\beta$ , que conlleva a la acumulación de este péptido y a una serie de eventos en cascada que producen la demencia de Alzheimer.

Actualmente, el tratamiento de la EA consiste en la administración de fármacos que disminuyen los síntomas de la enfermedad. La hipótesis amiloide ha permitido el desarrollo de estrategias que consideran al péptido A $\beta_{42}$  como un blanco terapéutico. Con base en numerosos estudios se ha encontrado que el uso de anticuerpos anti-A $\beta$  en modelos animales, correlaciona con el mejoramiento de las funciones cognitivas.

Una alternativa de la inmunización activa con el péptido A $\beta_{42}$  para la prevención y/o tratamiento de la EA, es la inmunización pasiva con anticuerpos protectores. Estos anticuerpos se pueden seleccionar a partir de bibliotecas de fragmentos de anticuerpos desplegadas en fago, específicos para el péptido A $\beta_{42}$ . Se puede caracterizar una amplia gama de anticuerpos con todas las posibles especificidades, entre las cuales estarán los anticuerpos recombinantes con propiedades protectoras sin efectos secundarios. La administración pasiva de los fragmentos de anticuerpos carentes del fragmento Fc, tendrían la ventaja de no activar a la microglía y evitar un proceso inflamatorio.

Por lo anterior, la estrategia experimental de la que es objeto el presente trabajo es valiosa debido a que permite la selección de anticuerpos recombinantes con una gran variedad de especificidades contra los epítomos lineales y conformacionales presentes en oligómeros del péptido A $\beta_{42}$ , lo que ayudará a estudiar una amplia gama de anticuerpos, entre las cuales estarán también las que tengan propiedades protectoras.

## OBJETIVO GENERAL

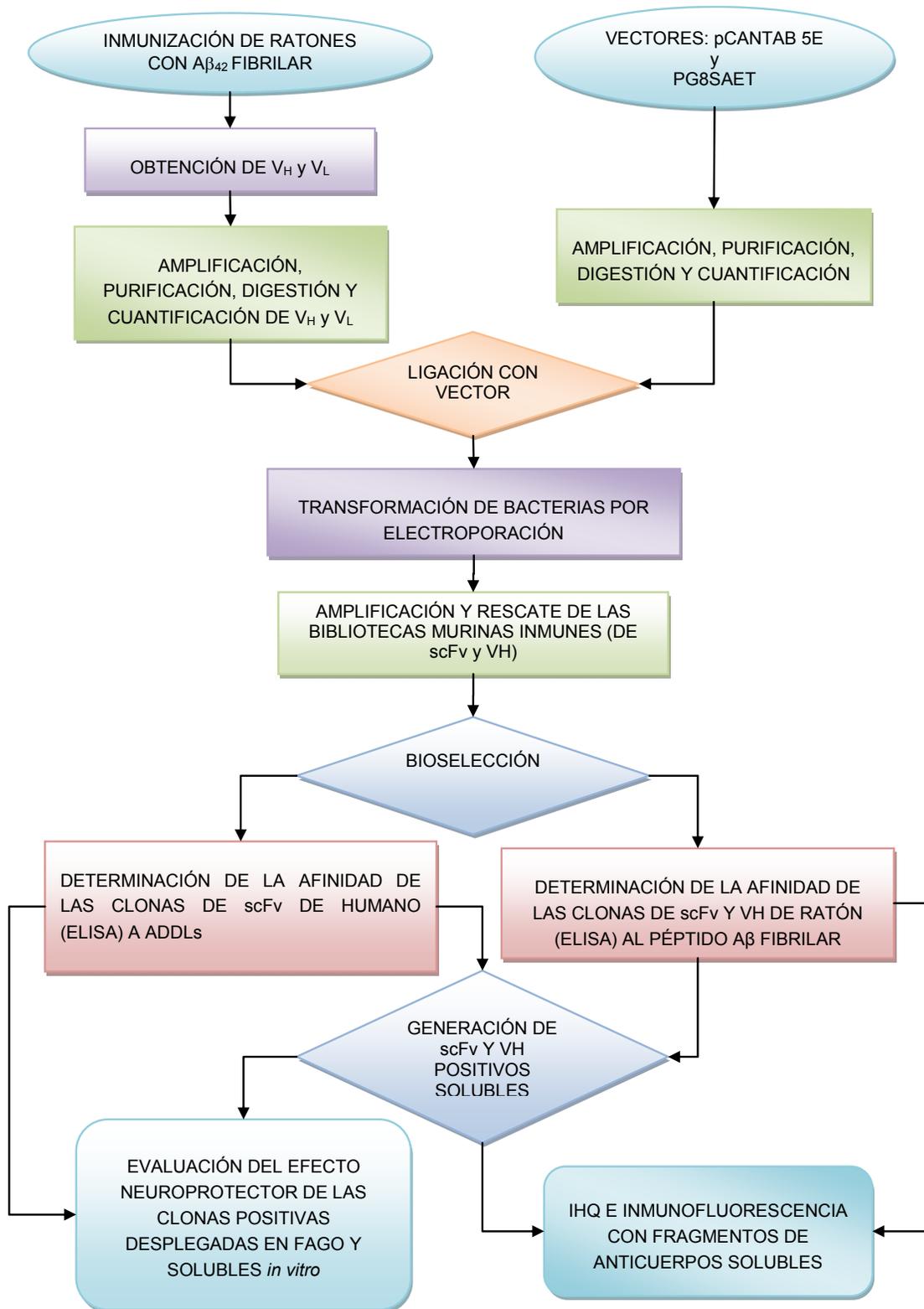
Generar, seleccionar y estudiar fragmentos de anticuerpos (scFv y VH), con todas las posibles especificidades contra los epítomos del péptido A $\beta$ <sub>42</sub>, a partir de bibliotecas desplegadas en el bacteriófago M13.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Inmunizar de forma activa e identificar animales hiperinmunes al péptido A $\beta$ <sub>42</sub>.
- Construir una biblioteca inmune de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) de inmunoglobulinas anti-A $\beta$ <sub>42</sub> desplegada en la proteína p3 del fago filamentoso M13, a partir de esplenocitos activados de ratones inmunizados previamente con el péptido A $\beta$ <sub>42</sub>.
- Construir una biblioteca inmune de fragmentos de cadena pesada sencilla (VH) de inmunoglobulinas anti-A $\beta$ <sub>42</sub> desplegada en la proteína p8 del fago filamentoso M13, a partir de esplenocitos activados de ratones inmunizados previamente con el péptido A $\beta$ <sub>42</sub>.
- Hacer bioselección (*biopanning*) de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) y de cadena pesada sencilla (VH) de inmunoglobulinas que se unan al péptido A $\beta$ <sub>42</sub> fibrilar.
- Hacer bioselección (*biopanning*) de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) de inmunoglobulinas anti-ADDLs (oligómeros solubles del péptido A $\beta$ <sub>42</sub>) a partir de una biblioteca no inmune (*naïve*) de scFv de humano.
- Caracterizar el reconocimiento de los fragmentos de anticuerpos seleccionados (scFv y VH) al péptido A $\beta$ <sub>42</sub>, mediante un ensayo de ELISA.
- Mapear epítomos del péptido A $\beta$ <sub>42</sub>, empleando fragmentos traslapados de este péptido, por los anticuerpos recombinantes.
- Generar fragmentos de anticuerpos solubles (scFv y VH).
- Evaluar el efecto neuroprotector de los anticuerpos recombinantes desplegados en el fago M13 y scFv solubles, en la línea celular SH-SY5Y.

- Realizar inmunohistoquímica e inmunofluorescencia de secciones coronales de cerebros de ratones wt y Tg2576 empleando los fragmentos de anticuerpos solubles.

# ESQUEMA METODOLÓGICO



## METODOLOGÍA

### INMUNIZACIÓN DE ANIMALES CON EL PÉPTIDO $\beta$ -AMILOIDE 1-42 ( $A\beta_{42}$ )

#### ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN DE ANIMALES CON EL PÉPTIDO $A\beta_{42}$

Se empleó el protocolo de inmunización de Gevorkian et al, 2004, en donde se inmunizó un grupo de 3 ratones macho Balb/C de 4-6 semanas de edad. El procedimiento consistió en la inyección subcutánea de 30  $\mu$ g del péptido  $A\beta_{42}$  humano/100  $\mu$ l/animal (AnaSpec Inc., San Jose, CA, USA). El péptido fue resuspendido en PBS e incubado toda la noche a 0.6 mg/ml a 37°C. Esta suspensión inmunogénica fue emulsificada, en un volumen igual de adyuvante completo de Freund, (Sigma). Después se aplicaron tres refuerzos subsiguientes, a intervalos de 15 días. Los ratones control fueron inmunizados únicamente con PBS y adyuvante de Freund. Después de la tercera y cuarta inmunización, los ratones fueron anestesiados en una cámara con Sevoflurane (sevoflurano, Abbot Laboratories, DF, Mex.) y sangrados por plexo retroocular (100-200  $\mu$ l/animal). Se obtuvo la fracción de suero mediante la coagulación de la sangre a temperatura ambiente (TA) por 1 hr., posteriormente 2 hrs. a 37°C. Se centrifugó en microfuga a 4000 r.p.m. por 5 min. a 4°C. Los sueros fueron almacenados a -20°C hasta su uso posterior.

#### ELISA DE SUEROS PARA DETECTAR ANTICUERPOS ANTI- $A\beta_{42}$

La identificación de ratones con sueros con altos títulos de anticuerpos contra el péptido  $A\beta_{42}$  fibrilar, se llevó a cabo mediante un ensayo de ELISA, de acuerdo al protocolo estándar descrito por (Gevorkian et al, 2004).

Para el ensayo de ELISA se sensibilizó una placa de poliestireno de 96 pozos Maxisorp (Nunc, Rochester, NY, USA) con el péptido  $A\beta_{42}$  fibrilar (0.2  $\mu$ g/100  $\mu$ l/pozo) en amortiguador 0.1 M de carbonato de sodio, pH 9.6 a 4°C por toda la noche. Después los pozos se lavaron cuatro veces con un sistema para microplacas automatizado (Denley, Well Wash 4) con una solución de PBS/0.2% Tween-20 (Sigma) a pH 7.4. Posteriormente, los pozos se bloquearon con 200  $\mu$ l de la solución PBS/2% BSA fracción V (Sigma). Después de lavar como se mencionó, se incubaron los pozos con una alícuota de 100  $\mu$ l / pozo de suero diluido 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800 y 1:25600 en la solución PBS/1% BSA (Sigma)/0.1% Tween-

20 y como control se utilizó el suero de los ratones inmunizados con PBS y adyuvante de Freund (Sigma). Después de 1 hr. de incubación a 37°C, los pozos se lavaron nuevamente como se indicó anteriormente y para revelar se agregó un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa (HRP) anti-IgG de ratón (Zymed, San Francisco, CA, USA) a una dilución 1:5000 en la misma solución. Después de la incubación por un período de 1 hr. a 37°C y del lavado del exceso de segundo anticuerpo, se agregó a cada pozo el sustrato cromogénico 2,2-azino-di-(3-etilenziazolano-6-ácido sulfónico) *single solution* (ABTS) (Zymed, San Francisco, CA, USA) y se leyó la placa a una absorbencia de 405 nm con referencia a 450 nm en un lector automatizado (Opsys Mr, Dynex Tech., Chantilly, VA, USA). Como control negativo se empleó un péptido no relacionado (0.5 µg/100 µl/pozo) con la siguiente secuencia: AALSPGSSAYPSATVLA (AnaSpec, San Jose, CA, USA).

## **CONSTRUCCIÓN DE UNA BIBLIOTECA DE FRAGMENTOS VARIABLES DE CADENA SENCILLA (scFv) DE INMUNOGLOBULINAS ANTI-A $\beta$ <sub>42</sub>**

Para la construcción de la biblioteca de scFv anti-A $\beta$ <sub>42</sub> de ratón, se utilizaron células del bazo de ratones inmunizados con A $\beta$ <sub>42</sub> fibrilar. Los animales hiperinmunes seleccionados para estos fines, recibieron una última inmunización subcutánea con 30 µg/100 µl del inmunógeno quince días antes de ser sacrificados para la obtención de sus esplenocitos activados. Los animales inmunizados fueron anestesiados, sangrados a blanco y sacrificados por dislocación cervical. Los esplenocitos fueron disociados del bazo en condiciones asépticas, dentro de una campana de flujo laminar de seguridad biológica Nivel 1 (VECO, Jiutepec, Mor. Mex.). Los esplenocitos colectados a partir de este tejido, fueron lavados con D-PBS (NaCl 138 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.1 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM) y lisados los eritrocitos con un amortiguador de lisis (NH<sub>4</sub>Cl 155 mM, KHCO<sub>3</sub> 10mM, EDTA.2Na 0.1 mM) por 10 min. en agitación ocasional.

Se obtuvo el mRNA total de los esplenocitos de los ratones inmunizados mediante el kit de purificación ("*Fast Track 2.0 for isolation of mRNA*", Invitrogen life Technologies, USA).

Se sintetizó el cDNA a partir del mRNA purificado de estas células mediante un kit de síntesis de DNA ("*DNA Synthesis module RPN 1256*", Amersham Pharmacia Biotech, USA). Para la obtención de la primera cadena de cDNA de anticuerpo se utilizó el *primer Random hexanucleotide*, la mezcla de reacción, la solución de DTT y la incubación a 37°C por 1 hr. La primera cadena de cDNA se usó como templado para

la amplificación primaria por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) o reacción en cadena de la polimerasa, mediante el empleo del kit ("*Recombinant Phage Antibody System for cloning mouse antibody genes*", Amersham Biosciences, USA). El cDNA obtenido mediante el procedimiento anterior se utilizó para llevar a cabo dos reacciones de PCR diferentes, una con oligos para amplificar las cadenas ligeras (*light primer mix*) con la enzima Taq platinum polimerasa (Invitrogen, USA) y la otra con oligos para amplificar las cadenas pesadas (*heavy primer 1 y 2*) con Taq platinum. Se realizaron 30 ciclos (94°C-1', 55°C-2', 72°C-2'') en un termociclador Gene Cyclor (Bio-Rad, USA). Los productos de PCR se purificaron mediante electroforesis en gel Tris-EDTA (TAE) agarosa 1.5% con un amortiguador TAE 1X a 60 V DC y el Kit "*Rapid Gel Extraction System*" (Marligen Biosciences Inc, USA) y se cuantificaron.

Después se llevó a cabo la reacción de ensamblaje para unir los fragmentos de DNA de la cadena pesada y ligera de inmunoglobulinas con un *linker* de DNA. Para la reacción de ensamblaje se utilizó un *linker* de DNA (*linker primer mix*), que se alinea con los productos de PCR de la cadena pesada (20 ng) y con los productos de PCR de la cadena ligera (20 ng) siguiendo las instrucciones del fabricante ("*Recombinant Phage Antibody System for cloning mouse antibody genes*", Amersham Biosciences, USA).

En una segunda amplificación por PCR, se amplificó el DNA del scFv ensamblado, mediante la adición de polimerasa Taq platinum (Invitrogen, USA), dNTP mix y el *RS primer mix* para adicionar los sitios de restricción (5' Sfi I y 3' Not I), para la clonación del DNA en el vector fagémido (pCANTAB 5E), siguiendo las recomendaciones del fabricante ("*Recombinant Phage Antibody System for cloning mouse antibody genes Expression Module*", Amersham Biosciences, USA).

Se purificó el DNA de la construcción generada mediante electroforesis en gel de TBE 1.5% agarosa con un amortiguador TBE (Tris-base-ácido bórico-EDTA) 1X a 100 V del que se removió la banda de DNA de ~800 pb. Se utilizó el kit "*Gel Extraction Systems*", (Marligen Bioscience Inc, USA).

Se realizó una amplificación mediante PCR del DNA de los scFv con *RS primer mix*, *dNTP mix*, polimerasa Platinum Taq y amortiguador para PCR por 30 ciclos (94°C-1', 55°C-2'', 72°C-2'') en el termociclador Gene Cyclor (Bio-Rad, USA). Los productos de PCR se purificaron como se mencionó anteriormente. El DNA de los scFv se cuantificó mediante una electroforesis en gel TBE 1X 1.5% agarosa a 100 V DC con el *scFv Marker* para comparación visual ("*Recombinant Phage Antibody System for cloning mouse antibody genes Expression Module*", Amersham Biosciences, USA).

Se digirió el DNA de los scFv con la enzima de restricción Sfi I, de acuerdo a las indicaciones del fabricante (New England Biolabs, USA), durante 3 hrs. a 50°C. Posteriormente, se digirió el DNA de los scFv con la enzima de restricción Not I (New England Biolabs, USA) durante 1 hr. a 37°C. Se purificó el DNA de los scFv con los sitios de restricción Sfi I/Not I mediante el kit "*Rapid PCR Purification Systems*" (Marligen, Bioscience Inc, USA).

Se llevó a cabo la reacción de ligación del DNA de los scFv (50 ng) con el vector fagémido pCANTAB 5 E (60 ng) con DNA ligasa (400 unidades) (New England Biolabs, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La reacción se incubó toda la noche a 16°C.

Se prepararon células *E. coli* TG1 electrocompetentes mediante el protocolo modificado de Sambrook-Russell (2001). Se electroporó toda la reacción de ligación en alícuotas de 45 µl de bacterias *E. coli* TG1 ( $4.5 \times 10^5$  bacterias) electrocompetentes en 5 s a 2.5 Kvolts y 2.5 µF en un sistema de Gene Pulser II, (Bio-Rad, USA). Se realizaron 34 electroporaciones y se recuperaron en un volumen total de 12 ml de medio SOC. Después de electroporar todo el DNA de los scFv, las células se dejaron recuperar a 37°C por 40 min. sin agitación. De esta suspensión de células, se tomaron alícuotas de 3 y 30 µl para plaquearlas y determinar la complejidad de la biblioteca. Posteriormente se dejaron incubando a 37°C por una hr. con agitación en un Orbital Incubator Shaker (Amerex Instruments, Inc) y se agregó carbenicilina (50 µg/ml) (Sigma). Se incubaron las células por dos hrs. a 37°C.

Posteriormente se les infectó con el fago helper M13K07 (Invitrogen, USA) (que aporta las proteínas necesarias para el ensamblaje de los fagos con el inserto), a una multiplicidad de infección (MOI) de 10, dejándolas incubar 30 min. a 37°C sin agitación y después otros 30 min. a 37°C con agitación. Se siguió el protocolo del kit "*Recombinant Phage Antibody System for cloning mouse antibody genes Expression Module*" (Amersham Biosciences, USA).

Después de este tiempo se llevaron las células a un volumen total de 50 ml de medio 2X YT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) con carbenicilina (50 mg/ml) (Sigma) y kanamicina (50 mg/ml) (Sigma), para una incubación de toda la noche a 30°C en agitación.

Se siguió el protocolo del kit "*Recombinant Phage Antibody System for cloning mouse antibody genes Expression Module*" (Amersham Biosciences, USA) para la purificación de los fagos mediante una doble precipitación con 1/5 NaCl (2.5 M) PEG-8000 (20% w/v) y centrifugación. Esto permite concentrar a los anticuerpos desplegados en fago

de los solubles presentes en el medio, que pueden competir por el antígeno durante la selección. Los fagos se resuspendieron en TBS y se tituló la biblioteca en células *E. coli* TG1 y medio LB-agar con carbenicilina (50 mg/ml) (Sigma) y glucosa (2%) (Sigma).

## **CONSTRUCCIÓN DE UNA BIBLIOTECA DE VH DE INMUNOGLOBULINAS ANTI-A $\beta$ <sub>42</sub>**

Dado que la cadena pesada (V<sub>H</sub>) puede mantener reactividad por los epítomos de interés (péptido A $\beta$ ) y esto permite trabajar con recombinantes más pequeños, se generó otra biblioteca construida con el DNA de la cadena pesada (V<sub>H</sub>) de la biblioteca inmune de ratón antes mencionada.

Se amplificó el fragmento V<sub>H</sub> por PCR en un termociclador Gene Cycler (Bio-Rad, USA), empleando la solución amortiguadora para polimerasa Taq DNA recombinante 10X (Altaenzymes), MgCl<sub>2</sub> (Altaenzymes), dNTP, primer 3' LINK, primer 5'PCANT, polimerasa Taq, (Altaenzymes) y 50 ng del fragmento de V<sub>H</sub>. Se realizaron 25 ciclos de amplificación: 94°C-1', 70°C-30'', 72°C-30''.

La purificación del V<sub>H</sub> amplificado se realizó mediante un kit de purificación para PCR ("*Concert Rapid PCR purification System*", Marligen Bioscience, Inc., USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El fragmento V<sub>H</sub> se digirió con las enzimas Hind III (New England Biolabs, USA) durante 1h a 37°C. Posteriormente, el fragmento fue digerido con la enzima de restricción Nco1 (New England Biolabs, USA) durante 1h a 37°C. El vector PG8SAET fue digerido de la misma forma con las enzimas Hind III (New England Biolabs, USA) y Nco1 (New England Biolabs, USA).

El vector se purificó mediante electroforesis en un gel de agarosa (Invitrogen, USA) al 1% en amortiguador de TBE 1X, a un voltaje constante de 100 V durante 1h. Posteriormente, el DNA del vector fue purificado con un kit, de acuerdo a las instrucciones del fabricante ("*Concert Rapid PCR purification System*", Marligen Bioscience, Inc., USA).

Se llevó a cabo la reacción de ligación del DNA del fragmento de V<sub>H</sub> (70 ng) con el vector fagémido PG8SAET (35 ng) con DNA ligasa (400 unidades) (New England Biolabs, USA). La reacción se incubó toda la noche a 16°C.

Se electroporó toda la reacción de ligación como se explicó con anterioridad.

Las células transformadas se infectaron con el fago helper M13KO7 (Invitrogen, USA) con una MOI de 10, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

Con este cultivo se inocularon 40 ml de medio 2X YT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) con carbenicilina (50 mg/ml) (Sigma) y kanamicina (50 mg/ml) (Sigma). El cultivo se incubó a 37°C en agitación (250 r.p.m.) durante toda la noche. Posteriormente el cultivo se centrifugó a 6000 r.p.m. 20 min. a 4°C. El sobrenadante se colectó, se le agregó 1/6 parte de PEG/NaCl (PEG-8000, 20% w/v; NaCl 2.5 M) y se incubó a 4°C durante 4 hrs. En seguida se centrifugó a 10000 r.p.m. durante 10 min. a 4°C y el precipitado se resuspendió con 1 ml de TBS estéril. Se repitió la precipitación con 1/6 parte de PEG/NaCl durante 2 hrs. a 4°C. Para concentrar los fagos se centrifugó durante 10 min. y 14000 r.p.m. a 4°C y se resuspendió con TBS. Con el sobrenadante se hicieron 3 diluciones seriadas 1:1000 se infectó *E. coli* TG1 a una densidad óptica de  $A_{600}=0.7$  con 200  $\mu$ l de fagos purificados, durante 45 min. a 37°C. Después se sembraron por extensión con varilla en placas que contenían 15 ml de medio LB-agar y 15  $\mu$ l de carbenicilina (50 mg/ml) (Sigma). Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C. Finalmente se contaron las colonias.

## **BIOSELECCIÓN DE scFv Y VH ANTI-A $\beta$ ESPECÍFICOS A PARTIR DE UNA BIBLIOTECA DE RATÓN INMUNE**

La selección de scFv y VH de la biblioteca de ratón inmune se llevó a cabo esencialmente siguiendo el protocolo descrito en Manoutcharian et al, (2003) y Manoutcharian et al, (2004), que brevemente se describe a continuación.

Para la bioselección de scFv y VH anti-A $\beta_{42}$  fibrilar, se sensibilizaron 4 pozos de una placa de poliestireno de 96 pozos Maxisorp (Nunc, Rochester, NY, USA) con 0.5  $\mu$ g/100  $\mu$ l del péptido A $\beta_{42}$  (AnaSpec, San Jose, CA, USA) fibrilar disuelto en amortiguador de carbonatos pH 9.6 a 4°C toda la noche. Se lavaron los pozos con una solución de PBS/0.2% Tween-20 y se bloquearon con una solución de PBS/2% BSA durante 1h a 37°C. Después del lavado de los pozos, se adicionaron las bibliotecas de ratón inmune y se incubó por 4 hrs. a 4°C y 30 min. a TA. Posteriormente, se lavaron los pozos con PBS/0.2% Tween-20 y se eluyeron los fagos con trietilamina (TEA) 0.1M durante 30 min. a TA, neutralizando con Tris-HCl (1M), pH 7.5.

Cada eluido de scFv y VH se tituló en células *E. coli* TG1 al plaquar sobre agar LB con Ampicilina (100  $\mu$ g/ml) y para el caso de scFv, 2% de glucosa. Se hicieron dos rondas de bioselección.

---

## SELECCIÓN DE LAS CLONAS QUE TIENEN EL INSERTO DE scFv O VH DEL TAMAÑO ADECUADO

De las dos rondas de bioselección de ambas bibliotecas de ratón inmune, se determinó qué clonas tenían el inserto (VH o scFv) y se caracterizaron como se indica a continuación:

Para determinar qué porcentaje de fagos expresaron el inserto (VH o scFv), se picaron al azar colonias de las placas empleadas para titular la biblioteca. Para extraer el DNA se tomó una muestra de cada colonia y fueron colocadas en 20  $\mu$ l de agua mili-Q estéril. En seguida se calentaron a 95°C durante 10 min. y se centrifugaron a 12000 r.p.m. durante 10 min. Del sobrenadante (que contiene el DNA de fago recombinante) se tomaron 5  $\mu$ l para amplificarse por PCR, empleando la Taq polimerasa (Altaenzymes). Se realizaron 20 ciclos de PCR: 94°C-30'', 62°C-30'' y 70°C-30'.

---

## ELISA DE LAS CLONAS DE scFv Y VH DE RATÓN INMUNE DE LA PRIMERA Y SEGUNDA RONDA DE BIOSELECCIÓN

Se realizó un ELISA con las clonas con el tamaño del inserto adecuado, que se obtuvieron de la primera y segunda ronda de bioselección de ambas bibliotecas ( $10^{11}$  fagos/100  $\mu$ l/pozo/clona), de acuerdo al protocolo descrito anteriormente.

La dilución de los fagos se hizo en una solución de PBS/0.1% BSA/0.1% Tween-20 durante 4 hrs. a 4°C y 30 min. a TA. Transcurrido este tiempo la placa fue lavada y la interacción de los fagos con el péptido A $\beta$  se reveló con 100  $\mu$ l de un anticuerpo monoclonal anti-M13 (dilución 1:5000) acoplado a la enzima HRP y se reveló con ABTS. Como control negativo se utilizó fago M13. Como control positivo se utilizó una dilución del fago (bB4.4) que expresa un scFv previamente reportado que reconoce al péptido A $\beta_{42}$  (Gevorkian et al, 2004). Se leyó la placa a una absorbencia de 405 nm con referencia a 450 nm en un lector automatizado (Opsys Mr, Dynex Tech., Chantilly, VA, USA).

---

## PREPARACIÓN DE ADDLS

### *MONOMERIZACIÓN*

Para la monomerización del péptido A $\beta_{42}$  (Anaspec Inc., San Jose, CA, USA) se disolvió en 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) a 5 mM (Sigma), siguiendo el protocolo de Klein (2002). Se hicieron alícuotas y se dejó evaporar el HFIP por toda la noche en la campana de extracción. Se eliminaron trazas de humedad al evaporar en

el *speedvacuum* durante 30 min. a TA. Se guardaron las alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$  con desecador para su uso posterior.

### OLIGOMERIZACIÓN (ADDLS)

Una alícuota de 90  $\mu\text{g}$  de monómero del péptido  $\text{A}\beta$  se disolvió en 4  $\mu\text{l}$  de Dimetilsulfóxido anhidro (5 mM) (DMSO, Sigma), se sonicó (Aquasonic, VWR Scientific Products, Model SOT) por 10 min. Se agregaron agitando 196  $\mu\text{l}$  de PBS y se sonicó por otros 10 min. La concentración final del stock fue de 100  $\mu\text{M}$ . La solución se dejó en agitación suave al menos por 72 hrs. a  $4^{\circ}\text{C}$ .

## BIOSELECCIÓN DE scFv ANTI-ADDLS A PARTIR DE UNA BIBLIOTECA DE scFv DE HUMANO NO INMUNE

Para la bioselección de scFv de la biblioteca de humano (*naïve*) con ADDLS, se siguió el protocolo descrito anteriormente.

Cada eluído se tituló en células *E. coli* TG1 plaqueadas sobre agar LB con Ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Sigma) y 2% de glucosa (Sigma). Se hicieron cuatro rondas de bioselección.

### ELISA DE LAS CLONAS DE scFv DE HUMANO NO INMUNE DE LA TERCERA Y CUARTA RONDA DE BIOSELECCIÓN

Las clonas que se obtuvieron de la tercera y cuarta ronda de bioselección que tuvieron el tamaño del inserto adecuado, se evaluaron por medio de un ensayo de ELISA de acuerdo al protocolo descrito con anterioridad.

## MAPEO DE EPÍTOPOS DE LAS CLONAS POSITIVAS (scFv Y VH) USANDO PÉPTIDOS TRUNCADOS DEL PÉPTIDO $\text{A}\beta_{42}$

Para determinar qué región del  $\text{A}\beta_{42}$  es reconocida por las clonas seleccionadas, se empleó un protocolo estándar de ELISA descrito por Gevorkian (2004). En este ensayo se emplearon placas de poliestireno Maxisorp (Nunc, Rochester, NY, USA) de 96 pozos. Se adsorbió el péptido  $\text{A}\beta_{42}$  (0.2  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}/\text{pozo}$ ) diluido en amortiguador de carbonatos (pH 9.6). Se empleó una concentración de 0.5  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  para los péptidos truncados  $\text{A}\beta_{8-42}$ ,  $\text{A}\beta_{1-16}$ ,  $\text{A}\beta_{12-28}$  y  $\text{A}\beta_{17-42}$  (AnaSpec, San Jose, CA, USA) y para el péptido no relacionado (AnaSpec, CA, USA). Para todos los péptidos la incubación fue durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Después de la adsorción del antígeno peptídico, los pozos se lavaron cuatro veces con un sistema para microplacas automatizado

(Denley, Well Wash 4). Para los lavados se empleó una solución de PBS/0.2% Tween-20 (Sigma) a pH 7,4. Posteriormente, se llevó a cabo un procedimiento de bloqueo con 200  $\mu$ l de la solución PBS/2% leche descremada durante 1 hr. a 37°C. La placa se sometió a otro procedimiento de lavado como se mencionó anteriormente. Se agregaron  $1 \times 10^{11}$  fagos/pozo de cada clona, que tuvieran el tamaño del inserto adecuado y que reconocieran al péptido A $\beta_{42}$ . Se empleó la misma cantidad de una clona negativa, para usarlo como control negativo. La dilución de los fagos se hizo en una solución de PBS/2% leche descremada/0.2% Tritón X-100 (Sigma) durante 4 hrs. a 4°C y 30 min. a TA. Transcurrido este tiempo la placa fue lavada de la forma anteriormente señalada. Los fagos que quedaron en la placa interactuando con el péptido A $\beta$  fueron revelados con 100  $\mu$ l de un anticuerpo monoclonal anti-M13 acoplado a la enzima HRP (Amersham, Pharmacia, Biotech, USA), durante 1 hr. a 37°C. El anticuerpo conjugado a HRP fue diluido 1:5000 en PBS/2% leche descremada/0.2% Tritón X-100. Posteriormente se lavó de la forma anteriormente indicada. La reacción se desarrolló con 100  $\mu$ l/pozo del sustrato 2,2-azino-di-(3-etilenziazolano-6-ácido sulfónico) ("ABTS", Zymed, USA) a 37°C y se leyó la placa a una absorbancia de 405 nm con referencia a 450 nm en un lector automatizado (Opsys Mr, Dynex Tech., Chantilly, VA, USA).

**ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LA NEUROTOXICIDAD MEDIADA POR ADDLS (*A $\beta$ -DERIVED DIFFUSIBLE LIGANDS*) EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO (SH-SY5Y), CON TODAS LAS CLONAS POSITIVAS DESPLEGADAS EN FAGO (scFv Y VH)**

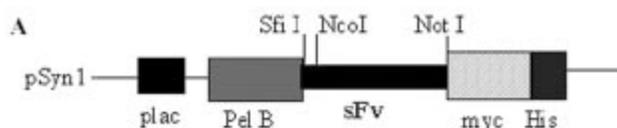
Todas las clonas positivas de fragmentos de anticuerpo desplegados en fago en ELISA fueron evaluadas en ensayos *in vitro*, con células SH-SY5Y de neuroblastoma humano (ATTC, VA, USA), con el fin de determinar la capacidad protectora de estos fragmentos de anticuerpos.

En estos ensayos se sembraron en placas de cultivo de poliestireno de 96 pozos (Costar, Corning Incorporated, NY, USA), 10 000 células/200  $\mu$ l de medio de cultivo DMEM/F12 (1:1) (Gibco-Invitrogen, NY, USA) con 10% SFB (Gibco-Invitrogen, NY, USA), 1% penicilina/estreptomicina (Gibco-Invitrogen, NY, USA) y 10  $\mu$ M de ácido retinoico (Sigma) para su diferenciación. Después de 8 días, se lavaron las células con PBS y se agregaron los ADDLs (AnaSpec, San Jose, CA, USA) en medio OPTI MEM (en ausencia de SFB y rojo de fenol) (Gibco-Invitrogen, NY, USA) con 200  $\mu$ g/ml de penicilina (Sigma) y 200  $\mu$ g/ml de estreptomicina (Sigma). Las clonas seleccionadas,

fueron preincubadas por 24 hrs. con los ADDLs a 4°C y posteriormente esta mezcla se adicionó a las células de neuroblastoma de humano SH-SY5Y. El péptido sintético A $\beta$ <sub>35-25</sub> (AnaSpec, San Jose, CA, USA) fue empleado como control negativo. Al término de una incubación del tratamiento de 24 hrs., se midió la viabilidad celular mediante la cuantificación de la actividad redox con un kit de XTT (Sodium 3' {1-[pheyaminocarbonyl]-3-4 tetrazolium}-bis {4-methoxy-6-nitro} benzene sulfonic acid hydrate) (*Cell Proliferation Kit XTT*, Roche, IN, USA). Se reduce el XTT por el metabolismo activo de las células por acción de enzimas mitocondriales que transforman la sal de tetrazolio en el colorante formazán, que es cuantificado en un espectrofotómetro después de una incubación de 4 hrs. a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> (Opsys Mr, Dynex Tech, Chantilly, VA, USA).

### EXPRESIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS (scFv) SOLUBLES MEDIANTE LA SUBCLONACIÓN EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pSyn1

Los insertos de scFv o VH fueron subclonados en el vector de expresión pSyn1, para la expresión de fragmentos de anticuerpos solubles. El vector de expresión pSyn1 está construido de tal manera que permite insertar una secuencia determinada y fusionarla al gen que codifica para el péptido señal de la peptidasa B (Pel B), lo que promueve la secreción de la proteína de interés al periplasma bacteriano. Su expresión es inducida con IPTG (isopropil tio- $\beta$ -D-galactosido) y su regulación se encuentra bajo el promotor *lac*. Presenta genes que le confieren al huésped resistencia a ampicilina y a kanamicina, pero esta última es eliminada al insertar una secuencia en el vector. El producto expresado contiene la etiqueta c-myc y la etiqueta 6-His en el extremo C-terminal, lo que facilita su purificación (Figura 3).



(Riaño-Umbarilla et al, 2005)

Figura. 3. Vector de expresión pSyn1, que permite expresar la proteína de interés fusionada con la peptidasa B (Pel B), para que se secrete en el periplasma bacteriano. La proteína de interés expresada contiene la etiqueta c-myc y 6-His en el extremo C-terminal, lo que facilita su purificación.

La expresión en pSyn1 y la purificación de los fragmentos de anticuerpos solubles se realizó siguiendo el reporte de Riaño-Umbarilla et al (2005).

Los insertos (DNA) de las clonas positivas de scFv fueron digeridos con *Sfi I* (New England Biolabs, USA) y *Not I* (New England Biolabs, USA). Posteriormente ligadas en el vector de expresión pSyn1 (DNA ligasa, New England Biolabs, USA). Las bacterias

*E. coli* TG1 fueron transformadas por electroporación con las construcciones (en 5 s a 2.5 Kvolts y 2.5  $\mu$ F en un sistema de Gene Pulser II, Bio-Rad, USA). Se crecieron las células recombinantes en un volumen de 500 ml de medio 2X YT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) hasta alcanzar una densidad óptica de  $A_{600}=0.7$  a 37°C.

La expresión de los scFv fue inducida con 1 mM de IPTG (Sigma). Después de 12 hrs., las células se cosecharon mediante centrifugación (600 r.p.m., 10 min., 4°C). El pellet fue resuspendido en 12.5 ml de amortiguador de extracción periplásmica (PPB) (20% sacarosa/1 mM EDTA/30 Mm Tris HCl, pH 8.0). La mezcla fue incubada en hielo por 20 min. Las células fueron centrifugadas a 6440 x g a 4°C por 20 min. El sobrenadante, que contiene las proteínas de scFv, fue colectado para su purificación posterior.

El pellet fue resuspendido en 5 mM de  $MgSO_4$ , se incubó en hielo durante 20 min. y se centrifugó a 6440 g a 4°C por 20 min. Los sobrenadantes de PPB y  $MgSO_4$  fueron mezclados y dializados dos veces contra 4 L de PBS. Finalmente, los scFv fueron purificados mediante cromatografía de afinidad  $Ni^{2+}$ -NTA (Invitrogen, USA), y eluidos con 2 ml de imidazol a 250 mM y dializados contra PBS.

---

## PRODUCCIÓN DE BACULOVIRUS RECOMBINANTES PARA LA EXPRESIÓN DE VH

### CÉLULAS Y CULTIVO

---

Las células utilizadas para propagar los Baculovirus recombinantes fueron Sf21 o Sf9 de *Spodoptera frugiperda* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y fueron cultivadas en monocapa y/o suspensión en medio Grace's (Sigma, St Louis, MD, USA) suplementado con 10 % (vol/vol) de suero fetal bovino, 1% de yeastolate, 1% de hidrolizado de lactalbumina y 1% de penicilina/estreptomina (Gibco, Grand Island, NY, USA.) e incubadas a 27 °C. En el caso de las células crecidas en suspensión se añadió 0.1% de ácido plurónico F68 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y se incubaron a 27°C y con una agitación de 100 r.p.m.

### CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS DE TRANSFERENCIA

---

Los plásmidos de transferencia pBlueHis-VH1.27, pBlueHis-VH2.8 y pBlueHis-1.28, fueron generados mediante la clonación de los fragmentos de PCR amplificados a partir de los VH clonados en pG8SAET. Para la amplificación se utilizó Taq DNA polimerasa de alta fidelidad (Expand High PCR System, Roche Biochemicals, USA) y los oligonucleótidos utilizados fueron para VH 1.27: 5-atcagatctgaaatgcagcagctca-3' y 5'-agagtcgactggagacggtgaccgtggt-3'; VH 2.8: 5'-atcagatctcaggtcaaaactgcaggagggag-3'

y 5' atcgtcgactggagacggtgaccgt-3; VH 1.28: 5'-atcagatctcaagtgcaggagtctgg-3' y 5'-atcgtcgactggagacggtgaccg-3', los cuales contienen los sitios de restricción BglII y SalI (subrayadas). Las condiciones de PCR fueron desnaturalización inicial 95 °C por 2 min.; 30 ciclos a 95°C-1', 55°C-1' y 72°C-1 y una extensión final a 72°C-10'. Los fragmentos amplificados fueron sujetos a electroforesis y purificados (QIAquick Gel Extraction Kit) para después ser ligados en el plásmido pBlueHis2B (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (previamente digerido con las enzimas de restricción BglII y SalI) utilizando la T4 DNA ligasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para analizar la integridad de las secuencias de los VHs, los plásmidos de transferencia fueron secuenciados utilizando el primer BacPCRfw 5'-tactgttttcgtaacagttttg-3' el cual se encuentra río arriba de la región de poli-histidinas (polyHis). La predicción de la secuencia final de aminoácidos se llevo a cabo utilizando el software ExPASy (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>).

### *PRODUCCIÓN DE LOS BACULOVIRUS RECOMBINANTES*

---

Los baculovirus recombinantes BacHisVH1.27, BacHis-VH2.8 y BacHis-VH1.28, fueron generados mediante recombinación homóloga de los plásmidos de transferencia con el DNA genómico lineal de AcMNPV *Bsu36I* Bac-N-Blue (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). En todos los casos, los VHs fueron incorporados bajo el promotor de la polihedrina dentro del genoma de AcMNPV *Bsu36I* Bac-N-Blue. Tanto los plásmidos de transferencia como el DNA genómico lineal de AcMNPV fueron co-transfectados mediante lípidos catiónicos (CELLFECTINE<sup>®</sup>, Invitrogen Carlsbad, CA, USA) en células Sf9. Una semana después, el medio de cultivo fue recolectado y diluido para realizar ensayos en placa utilizando agarosa de bajo punto de fusión (Sigma, St Louis, MD, USA) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosido (X-gal, Sigma, St Louis, MD, USA) para detectar la expresión del gen *lacZ* y confirmar la producción de baculovirus recombinantes. Después de dos rondas de purificación, los baculovirus fueron amplificados durante 7 días en células Sf21 o Sf9 cultivadas en suspensión. Finalmente, el medio se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 15 min. y el sobrenadante fue recolectado para realizar ensayos en placa y conocer el título viral. Los títulos virales obtenidos fueron de aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufc/ml.

### *PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS VH*

---

Para la producción de los VH se utilizaron  $1 \times 10^8$  células Sf9 cultivadas en 50 ml de medio Grace's ( $2 \times 10^6$ /ml) y se infectaron a 5 multiplicidades de infección (MOI) con el baculovirus recombinante. Las células se dejaron incubar durante 72 hrs. para la expresión de los VH. Las células se centrifugaron a 1200 r.p.m. durante 5 min. y el sobrenadante fue desechado. Posteriormente las células fueron lisadas con un

amortiguador de lisis para células de insecto (10mM Tris, 130 mM NaCl, 1% (v/v) Tritón X-100, 10 mM NaF, 10 mM Pirofosfato de sodio y amortiguador de fosfato de sodio 20 mM) con inhibidores de proteasas *mini Complete* (Roche, USA) e incubadas en hielo en esta solución durante 60 min. Al término de esta incubación para su aclaramiento se centrifugó la solución a 40 000 x g a 4°C durante 30 min. eliminando el pellet. Finalmente, los VH fueron purificados mediante cromatografía de afinidad Ni<sup>2+</sup>-NTA (Invitrogen, USA) y eluidos con 1 ml de imidazol a 250 mM.

---

## ANÁLISIS POR WESTERN-BLOT DE FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS SOLUBLES

Para detectar los fragmentos de anticuerpo solubles purificados por la columna de Ni<sup>2+</sup>-NTA se cargó 0.36 µg/12 µl de la fracción purificada en un gel comercial de poliacrilamida NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), con el amortiguador de corrida MES (*MES SDS Running Buffer*, NuPAGE, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a 100 V durante una 1 hr. 45 min. en un equipo *Xcell Sure Lock Mini-Cell* (Invitrogen, CA, USA).

Las proteínas separadas en el gel fueron transferidas hacia una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, USA), utilizando una cámara de transferencia semiseca (*Trans-Blot Semi-Dry*, Bio Rad) y el amortiguador de transferencia a pH 8.35 (Tris 0.025 M, Glicina 0.193 M y 20% de Metanol), durante 45 min. a 25 V, para posteriormente ser examinadas utilizando el anticuerpo específico para la etiqueta de la proteína (anti c-myc, Zymed-Invitrogen, CA, USA).

Para el inmunoblot, se lavó la membrana con PBS; se bloqueó con una solución de PBS/ 2% leche descremada durante 2 hrs. en agitación a TA. Posteriormente, se lavó la membrana en tres ocasiones con una solución de PBS/0.2% Tween-20 (Sigma). Se realizó la incubación de la membrana con el anticuerpo anti c-myc (dilución 1:1000) durante toda la noche a 4°C en PBS/2% leche descremada/0.2% Tritón X-100 (J.T. Baker). Para el revelado de la membrana se empleó un anticuerpo de cabra anti IgG1 de ratón conjugado a HRP a una dilución 1:2500 (Zymed-Invitrogen, CA, USA) durante 1 hrs. en agitación a TA. La membrana fue lavada de la misma forma antes mencionada. Las bandas inmunoreactivas fueron detectadas empleando el kit de quimioluminiscencia ("*SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate kit*", Pierce, USA).

## **ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LA NEUROTOXICIDAD MEDIADA POR ADDLS, EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO (SH-SY5Y), CON scFv SOLUBLES.**

Todas las clonas positivas de scFv solubles fueron evaluadas en ensayos *in vitro* en células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) (ATTC, VA, USA), con el fin de determinar la capacidad protectora de estos fragmentos de anticuerpos solubles.

En estos ensayos se sembraron en placas de cultivo de poliestireno de 96 pozos (Costar, Corning Incorporated, NY, USA), 40 000 células/200 µl de medio de cultivo DMEM/F12 (1:1) (Gibco-Invitrogen, NY, USA) con 10% SFB (Gibco-Invitrogen, NY), 1% penicilina/espreptomocina (Sigma) y 10 µM de ácido retinoico (Sigma) para su diferenciación, con cambio de medio cada dos días. Después de 10 días, se lavaron las células con PBS y se adicionaron diferentes concentraciones molares crecientes de cada clona de scFv (a una relación molar de anticuerpo:ADDLs 1:5, 1:10 y 1:20), manteniendo constante la concentración de ADDLs (5 µM) (AnaSpec, San Jose, CA, USA) en medio OPTI MEM (Gibco-Invitrogen, NY, USA) con 200 µg/ml de penicilina y estreptomocina (en ausencia de SFB y rojo de fenol) en un volumen final de 100 µl/pozo. Al término de una incubación de 24 hrs., se mide la viabilidad celular mediante la cuantificación de la actividad redox con un kit de XTT (Sodium 3'-(1-[pheyaminocarbonyl]-3-4 tetrazolium)-bis {4-methoxy-6-nitro} benzene sulfonic acid hydrate) (*Cell Proliferation Kit XTT*, Roche, IN, USA), después de 4 hrs. de incubación a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Los resultados han sido confirmados a través de la repetición experimental en tres ocasiones, permitiendo mostrar esta información con criterios de reproducibilidad.

El control negativo es el péptido Aβ<sub>35-25</sub> (5 µM) (Anaspec, San Jose, CA, USA), que no es tóxico para las células. El control positivo es la staurosporina (1 µM) (Sigma), un agente inductor de apoptosis.

## **ANÁLISIS POR INMUNOHISTOQUÍMICA DE SECCIONES CORONALES DE CEREBROS DE RATONES wt Y Tg2576 CON scFv SOLUBLES**

Se realizó la inmunohistoquímica de secciones coronales de cerebros de ratones transgénicos de la EA (Tg2576), para determinar si los fragmentos de anticuerpo reconocían las placas densas presentes en dichos animales. La línea de ratones transgénicos Tg2576 sobreexpresa la APP con la doble mutación sueca

KM670/671NL bajo el control del promotor de la proteína del prión en una cepa híbrida C57B6 x SJL. Estos animales desarrollan con la edad, déficit de memoria y aprendizaje asociados a la aparición de placas amiloides en áreas límbicas y corticales que se inicia en torno al año de edad (Hsiao et al, 1996).

Las secciones coronales de cerebros de ratón (40 µm) fueron tratadas siguiendo la metodología previamente reportada por Petrushina (2007), que brevemente consistió en lavar el tejido con TBS (Tris-HCl 100 mM /150 mM NaCl, pH 7.5) y pretratar con ácido fórmico al 70% (J.T. Baker, USA) por 10 min. Posteriormente, las secciones se lavaron con TBS y se eliminó el exceso de peroxidasas presentes en el tejido incubándolo con una solución de 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 10% de metanol en TBS durante 30 min. Después de esta incubación, las secciones se lavaron con TBS durante 5 min., seguido de un lavado con TBS-A (TBS/0.1% Tritón X-100) por 15 min. y por último con TBS-B (TBS/0.1% Tritón X-100/2% BSA) por 30 min. Para la incubación de los scFv anti-Aβ (5 µg/ml) en el tejido (durante toda la noche) y revelado se empleó el kit MOM (*“Mouse antibodies on mouse tissue”*, Vector Laboratories, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se desarrolló la reacción de tinción con el cromógeno 3,3'-diaminobencidina (DAB, Sigma).

## **ANÁLISIS POR INMUNOFLOURESCENCIA DE SECCIONES CORONALES DE CEREBROS DE RATONES wt Y Tg2576 EMPLEANDO scFv Y VH SOLUBLES**

### **INMUNOFLOURESCENCIA DE SECCIONES CORONALES DE CEREBROS EMPLEANDO FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS SOLUBLES (scFv Y VH) Y THIOFLAVINA T**

Las secciones coronales (40 µm) de cerebros de ratones transgénicos de la EA (Tg2576) y wt, se trataron para inmunohistología por fluorescencia.

Los cortes fueron lavados 2X con TBS y tratados con una solución de 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/10% metanol/TBS durante 30 min., para eliminar el exceso de peroxidasas presentes en el tejido. Después de esta incubación, las secciones fueron sometidas a un procedimiento de lavado, que consistió en incubarlos con TBS durante 5 min., seguido de TBS-A por 15 min. y por último con TBS-B por 30 min. La incubación de los scFv y VH anti-Aβ (5 µg/ml) con el tejido se realizó en la misma solución de TBS/5% suero de cabra (Sigma) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, los cortes fueron lavados durante 5 min. con la solución de TBS, TBS-A y TBS-B y se realizó una incubación del tejido con el anticuerpo anti-c-myc (dilución 1:1000) (Zymed-Invitrogen, Carlsbad, CA,

USA) en la solución bloqueadora de TBS/5% suero de cabra (Sigma) durante 2 hrs. a TA. Los cortes fueron lavados como se mencionó anteriormente para proseguir con la incubación del anticuerpo anti-IgG de ratón hecho en cabra conjugado al fluorocromo TRITC (dilución 1:300) (Sigma) durante 1 hr. a TA. A continuación los cortes fueron lavados en tres ocasiones con la solución de TBS durante 5 min.; en dos ocasiones con H<sub>2</sub>O milli-Q durante 5 min. y en dos ocasiones con etanol al 50% durante 5 min. Se realizó la incubación con una solución 0.5% thioflavina T/50% etanol durante 7 min. Al término de esta incubación, se lavaron las secciones de tejido en dos ocasiones durante 5 min. con 50% etanol, H<sub>2</sub>O milli-Q, TBS y PBS, para terminar con el montaje de dichas secciones.

#### INMUNOFLUORESCENCIA DE SECCIONES CORONALES DE CEREBROS DE RATONES WT Y TG2576 EMPLEANDO UN ANTICUERPO ANTI-A $\beta$ DE CONEJO Y scFv SOLUBLES

Para la doble inmunofluorescencia de secciones coronales de cerebros de ratones transgénicos de la EA (Tg2576) y wt, todos los cortes fueron lavados en una ocasión con TBS y H<sub>2</sub>O milli-Q. Se realizó el pretratamiento de las secciones con ácido fórmico al 70% durante 10 min. a TA, seguido de dos lavados con TBS durante 5 min. Para eliminar el exceso de peroxidasa presentes en el tejido, fue necesario el bloqueo previo de las peroxidasa endógenas, empleando una solución de TBS /10% metanol/3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min. a TA.

Después de esta incubación, las secciones fueron sometidas a un procedimiento de lavado que consiste en un lavado con TBS durante 5 min., seguido de un lavado con TBS-A por 15 min. y por último un lavado con TBS-B por 30 min. La incubación de los scFv anti-A $\beta$  (5 $\mu$ g/ml) en el tejido se realizó en la solución de TBS/5% suero de cabra (Sigma) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente los cortes fueron lavados durante 5 min. con la solución de TBS, TBS-A y TBS-B. Se realizó una incubación del tejido con el anticuerpo anti-c-myc (dilución 1:1000) en la solución TBS/5% suero de cabra (Sigma) durante 2 hrs. a TA. Los cortes fueron lavados como se mencionó anteriormente para proseguir con la incubación con el anticuerpo secundario AlexaFluor 488 hecho en cabra anti-ratón-sfx kit (Invitrogen, USA) (dilución 1:500) durante 2 hrs. a TA. A continuación los cortes fueron lavados durante 5 min. con la solución de TBS, TBS-A y TBS-B. Se realizó una incubación del tejido con un anticuerpo de conejo anti-A $\beta$  (dilución 1:1000) en la solución TBS/5% suero de cabra (Sigma) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, los cortes fueron lavados durante 5 min. con la solución de TBS, TBS-A y TBS-B e incubados con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo Alexa-fluor 594 (Invitrogen, USA) (dilución 1:1000) por

dos hrs. a TA. Finalmente, el tejido es lavado durante 5 min. con la solución de TBS, TBS-A y TBS-B para su montaje.

---

ANÁLISIS POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE LA UNIÓN DE LOS scFv SOLUBLES AL PÉPTIDO A $\beta$  EN SECCIONES CORONALES DE CEREBROS DE RATONES wt Y TG2576

El análisis por microscopia confocal se llevó a cabo en un sistema confocal FV1000 Olympus (Olympus Tokyo, Japan), empleando el objetivo de 60x UPLSAPO (NA=1.35). La fluorescencia de la thioflavina T (*thioflavin T*) o FITC fue obtenida después de excitar las muestras a 488 nm y las lecturas fueron registradas a 540 nm. Para la detección de Alexa-594, la longitud de onda de excitación fue 554 nm y la longitud de emisión fue registrada a 576 nm. El análisis de las imágenes y las reconstrucciones en tres dimensiones (3D) se llevaron a cabo utilizando el software Imaris 5.0.3 (Bitplane, Imaris™, Saint Paul, MN, USA.). Los controles fueron tratados con la misma intensidad de láser que para los scFv y VH

## RESULTADOS

### COMPLEJIDAD DE LA BIBLIOTECA DE FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS (scFv) ANTI-A $\beta$ <sub>42</sub>

La diversidad o complejidad de la biblioteca de fragmentos de anticuerpos (scFv) anti-A $\beta$ <sub>42</sub> fibrilar expresada en el bacteriófago M13 fue de  $2 \times 10^5$  ufc/ml (unidades de formación de colonia/ml). La complejidad representa la variabilidad de la biblioteca es decir, la cantidad de fagos que tienen genoma diferente en la biblioteca.

#### EVALUACIÓN DE FAGOS QUE EXPRESAN scFv Y VH EN LA BIBLIOTECA DE RATÓN INMUNE ANTI-A $\beta$ <sub>42</sub>

Se determinó el porcentaje de fagos que expresan los scFv en la biblioteca de ratón inmune (Figura 4). El DNA se obtuvo de 6 colonias de la cepa TG1 infectadas con la biblioteca de scFv. Dicho DNA se amplificó mediante PCR de colonias. Es importante mencionar que los scFv están formados a partir de los genes de las regiones variables (V) de las inmunoglobulinas de células de bazo (esplenocitos) de ratones inmunes anti-A $\beta$ <sub>42</sub>. Los genes de la región variable de la cadena pesada (VH) son de 400 pb, mientras que los genes de la región variable de la cadena ligera (VL) son de 350 pb. Además los scFv contienen un *linker* de 15 aminoácidos (Gly4Ser)<sub>3</sub> de 45 pb. Este péptido *linker* flexible se diseñó específicamente para poder unir el espacio de 3.5 nm que existe entre el carboxilo terminal de la cadena VH y el amino terminal de la cadena VL. Esta construcción facilita el acoplamiento de la cadena y minimiza problemas de recircularización y agregación que se presentan cuando las dos cadenas se expresan de manera individual.

En la figura se muestra el porcentaje de clones con el tamaño de inserto adecuado ( $\approx$  800 pb) de la biblioteca original, es decir, antes de ser sometida a un procedimiento de bioselección. De las seis colonias evaluadas, cuatro tuvieron el inserto del tamaño adecuado, lo cual corresponde a un porcentaje del 66% (Figura 4).



Figura 4. Electroforesis en gel de TAE-agarosa 1.5x con tinción de bromuro de etidio e iluminación con luz UV de seis colonias de la biblioteca de scFv de ratón inmune. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular. El carril 4 representa el control de PCR. Los carriles 6-10 representan el DNA de fagos de la biblioteca de sFv. El asterisco (\*) de los carriles 6, 8, 9 y 10 corresponden a la clonas con el tamaño del inserto adecuado ( $\approx$  800 pb).

## COMPLEJIDAD DE LA BIBLIOTECA DE FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS (VH) ANTI-A $\beta$ <sub>42</sub>

La diversidad o complejidad de fagos recombinantes de la biblioteca de fragmentos de anticuerpos (VH) anti-A $\beta$ <sub>42</sub> fibrilar expresada en el fago M13 fue de  $8 \times 10^4$  (ufc/ml).

### EVALUACIÓN DE FAGOS QUE EXPRESAN VH EN LA BIBLIOTECA DE RATÓN INMUNE ANTI-A $\beta$ <sub>42</sub>

Se determinó el porcentaje de fagos que expresan los VH de 340 pb, tamaño correspondiente al V<sub>H</sub> clonado en el genoma del fago. El DNA fue obtenido de 6 colonias, de la cepa TG1 infectadas con la biblioteca de VH. El DNA se amplificó por PCR utilizando F8 y PYS AET, que mapean 350 nucleótidos fuera del fragmento V<sub>H</sub>. En el gel de agarosa se esperaba observar un fragmento de aproximadamente 690 pb. De la biblioteca original, de las seis colonias evaluadas, solamente dos tuvieron el inserto del tamaño adecuado (Figura 5), lo cual corresponde al 33%.



Figura 5. Electroforesis en gel de TAE-agarosa 1.5x con tinción de bromuro de etidio e iluminación con luz UV de seis colonias de la biblioteca de VH de ratón inmune. En donde el carril 1 representa el marcador de peso molecular, el carril 2 es el control de PCR. Los carriles 5-10 representan el DNA de fagos de la biblioteca de VH. El asterisco (\*) del carril 7 y 10 corresponden a las clonas con el inserto V<sub>H</sub> del tamaño adecuado ( $\approx 690$  pb).

## BIOSELECCIÓN DE scFv Y VH DE RATÓN INMUNE ANTI-A $\beta$ <sub>42</sub> ESPECÍFICOS

Para identificar clonas reactivas al péptido A $\beta$ <sub>42</sub> en las bibliotecas de anticuerpos scFv y VH anti- A $\beta$ <sub>42</sub>, se realizaron dos rondas de bioselección con el péptido A $\beta$ <sub>42</sub> inmovilizado en placa.

En la tabla 2 se muestran los títulos de los eluidos obtenidos en dos rondas de bioselección de la biblioteca de scFv de ratón inmune anti-A $\beta$ <sub>42</sub> fibrilar. Los datos de entrada corresponden a la cantidad de fagos adicionados a cada pozo de la placa. Los datos de salida representan a los fagos que reaccionaron con el péptido A $\beta$ <sub>42</sub> en la placa y que fueron eluidos.

Ronda	Entrada (ufc/ml)	Salida (ufc/ml)
1a	$2 \times 10^{13}$	$4 \times 10^6$
2a	$1 \times 10^{14}$	$3 \times 10^7$

Tabla 2. Títulos de los eluidos de la biblioteca de scFv de ratón inmune anti-A $\beta_{42}$  fibrilar en cada ronda de bioselección. El título de entrada corresponde al usado para la bioselección y el de salida, el título obtenido de cada ronda de bioselección.

En la tabla 3 se muestran los títulos de los eluidos obtenidos en dos rondas de bioselección de la biblioteca de VH.

Ronda	Entrada (ufc/ml)	Salida (ufc/ml)
1a	$1 \times 10^{11}$	$2.4 \times 10^5$
2a	$4 \times 10^{12}$	$6 \times 10^6$

Tabla 3. Títulos de los eluidos de la biblioteca de VH de ratón inmune anti-A $\beta_{42}$  fibrilar en cada ronda de bioselección. El título de entrada corresponde al usado para la bioselección y el de salida el título obtenido de cada ronda de bioselección.

## EVALUACIÓN DE LAS CLONAS DE LAS BIBLIOTECAS DE scFv Y VH DE RATÓN INMUNE ANTI-A $\beta_{42}$ CON EL TAMAÑO DE INSERTO ADECUADO

Para identificar clonas reactivas al péptido A $\beta_{42}$  fibrilar de las bibliotecas de anticuerpos de scFv o VH de ratón inmune anti-A $\beta_{42}$  fibrilar, se realizaron dos rondas de bioselección con el péptido inmovilizado en placa.

Después de la primera ronda de bioselección de la biblioteca de scFv de ratón inmune anti-A $\beta_{42}$  fibrilar, se picaron al azar 20 clonas y se analizaron. De las 20 clonas

seleccionadas, 7 clonas tuvieron el tamaño de inserto adecuado ( $\approx 800$  pb), lo cual corresponde al 35% (Figura 6).

Se colectaron aleatoriamente diferentes clonas después de cada ronda de bioselección, para identificar aquellas con el tamaño de inserto adecuado. Posteriormente, fueron evaluadas en un ensayo de ELISA.

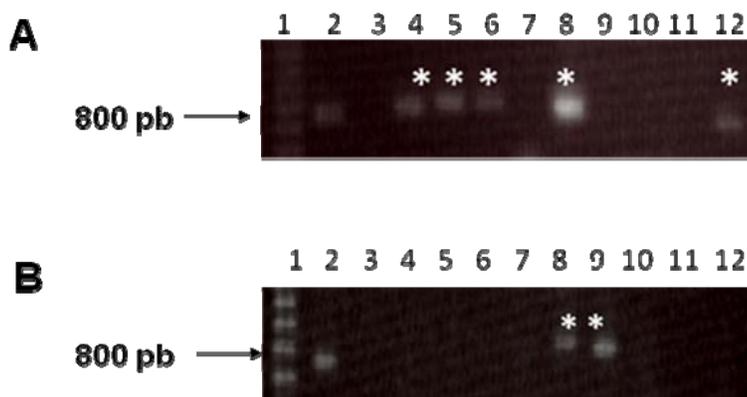


Figura 6. Análisis por PCR de las clonas obtenidas de la primera ronda de bioselección de la biblioteca de scFv de ratón inmune anti-A $\beta_{42}$  fibrilar. (A y B) El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular. El carril 2 corresponde al control de PCR. Los carriles del 3-12 representan a los productos de PCR amplificados del DNA de clonas de la primera ronda de bioselección. El asterisco (\*) indica las clonas que tienen el tamaño del inserto adecuado. Gel de TAE-agarosa 1.5x con tinción de bromuro de etidio e iluminación con luz UV.

Se hizo una segunda ronda de bioselección de la biblioteca de scFv de ratón inmune anti-A $\beta_{42}$  fibrilar y se picaron al azar 20 clonas para su análisis. De las 20 clonas seleccionadas, ninguna tuvo el tamaño de inserto adecuado ( $\approx 800$  pb) (Dato no mostrado).

Después de la primera ronda de bioselección de la biblioteca de VH de ratón inmune anti-A $\beta_{42}$  fibrilar, se picaron al azar 40 clonas y se analizaron. De las 40 clonas seleccionadas, 13 clonas tuvieron el tamaño de inserto adecuado ( $\approx 690$  pb), lo cual corresponde al 32.5% (Figura 7).

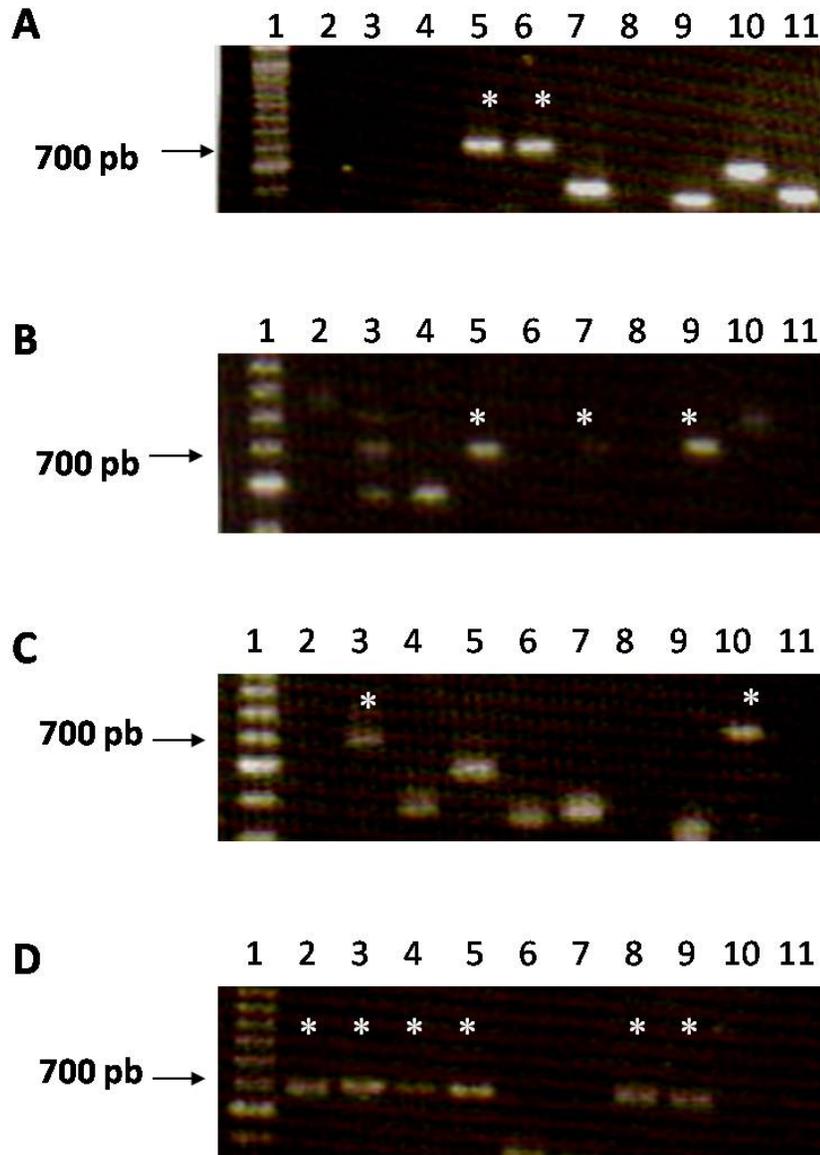


Figura 7. Análisis por PCR de las clonas obtenidas de la primera ronda de bioselección de la biblioteca de VH de ratón inmune anti-A $\beta$ <sub>42</sub> fibrilar. (A-D). El carril 1 representa al marcador de peso molecular. Los carriles del 2-11 representan a los productos de PCR amplificados del DNA de clonas de la primera ronda de bioselección. El asterisco (\*) indica las clonas que tienen el tamaño del inserto adecuado. Gel de TAE-agarosa 1.5x con tinción de bromuro de etidio e iluminación con luz UV.

Se hizo una segunda ronda de bioselección de VH anti-A $\beta$  como se describió anteriormente. Se picaron al azar 20 clonas y se analizaron. De las 20 clonas seleccionadas, 15 tuvieron el tamaño de inserto adecuado ( $\approx$  690 pb), lo cual corresponde al 75% (Figura 8).

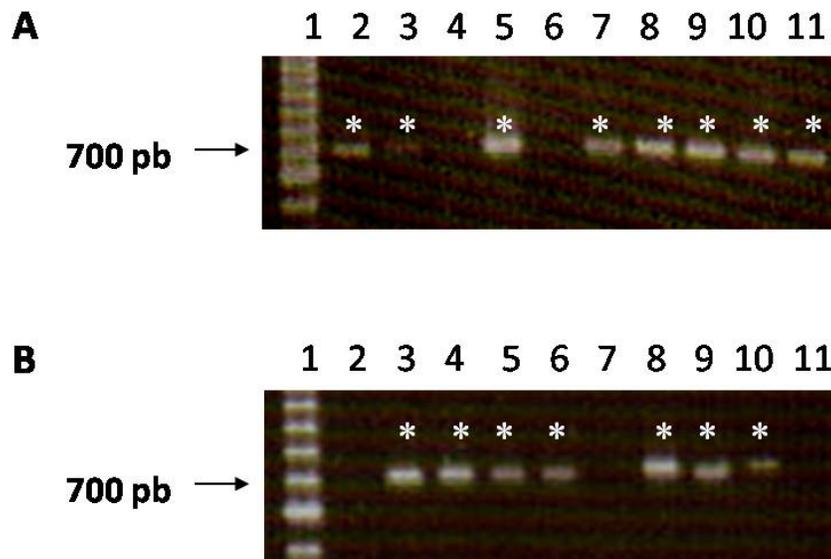


Figura 8. Análisis por PCR de las clonas obtenidas de la primera ronda de bioselección de la biblioteca de scFv de ratón inmune anti-A $\beta_{42}$  fibrilar (A y B). Los carriles del 2-11 representan a los productos de PCR amplificados del DNA de clonas de la primera ronda de bioselección. El asterisco (\*) indica las clonas que tienen el tamaño del inserto adecuado. Gel de TAE-agarosa 1.5x con tinción de bromuro de etidio e iluminación con luz UV.

## BIOSELECCIÓN DE scFv ANTI-ADDLS ESPECÍFICOS A PARTIR DE UNA BIBLIOTECA DE scFv DE HUMANO NO INMUNE

Actualmente se ha observado que no existe una correlación directa entre el número de placas amiloides y el daño cognitivo, pero si existe correlación entre la pérdida sináptica y los niveles del péptido A $\beta$  soluble, por lo tanto se ha sugerido que la patogénesis de la EA involucra especies solubles del péptido A $\beta$ . Estos oligómeros solubles (conocidos como ADDLs y protofibrillas) explican la baja correlación entre depósitos de fibrillas insolubles del péptido A $\beta$  y la progresión de la EA (Klein, 2002). En la actualidad, el número de referencias sobre los efectos protectores potenciales de la inmunoterapia con el péptido A $\beta$  en la neutralización de oligómeros del péptido A $\beta$ , va en crecimiento.

Es por esta razón que actualmente existe un gran interés en estas especies solubles para el tratamiento de la EA en un estado temprano. Por lo anterior se decidió trabajar con una biblioteca de scFv (*naïve*) de humano que se tiene disponible en el laboratorio, para hacer una nueva bioselección de clonas que reconozcan a los ADDLs del péptido A $\beta_{42}$ .

Para identificar clonas reactivas al péptido A $\beta_{42}$  soluble (ADDLs) en la biblioteca de anticuerpos scFv de humano no inmune, se realizaron cuatro rondas de bioselección con el péptido A $\beta_{42}$  soluble (ADDLs) (AnaSpec, San Jose, CA, USA) inmovilizado en placa.

En la tabla 4 se muestran los títulos de los eluidos obtenidos en 4 rondas de bioselección de la biblioteca de scFv de humano no inmune anti-A $\beta$ <sub>42</sub> soluble (ADDLs). Los datos de entrada corresponden a la cantidad de fagos adicionados a cada pozo de la placa. Los datos de salida representan a los fagos que reaccionaron con los ADDLs en la placa y que fueron eluidos.

<b>Ronda</b>	<b>Entrada (ufc/ml)</b>	<b>Salida (ufc/ml)</b>
1a	$3.2 \times 10^{11}$	$5.2 \times 10^3$
2a	$1.3 \times 10^{12}$	$3.5 \times 10^3$
3a	$1.56 \times 10^{11}$	$1.3 \times 10^6$
4a	$1.02 \times 10^{12}$	$1 \times 10^8$

Tabla 4. Títulos de los eluidos de la biblioteca de scFv de humano no inmune en cada ronda de bioselección. El título de entrada corresponde el usado para la bioselección y el de salida, el título obtenido de cada ronda de bioselección.

#### EVALUACIÓN DE LAS CLONAS DE LA BIBLIOTECA DE scFv DE HUMANO NO INMUNE ANTI-ADDLS CON EL TAMAÑO DE INSERTO ADECUADO

Para identificar clonas reactivas a ADDLs de la biblioteca de fragmentos de anticuerpos (scFv) de humano no inmune, se realizaron cuatro rondas de bioselección con el péptido inmovilizado en placa.

Se seleccionaron aleatoriamente diferentes clonas después de cada ronda de bioselección, para identificar clonas con el tamaño de inserto adecuado, las cuales fueron evaluadas en un ensayo de ELISA posterior.

Después de la primera ronda de bioselección de la biblioteca de scFv de humano no inmune, se picaron al azar 5 clonas y se analizaron. De las 5 clonas seleccionadas, 4 clonas tuvieron el tamaño de inserto adecuado ( $\approx 800$  pb), lo cual corresponde al 80% (Figura 9).

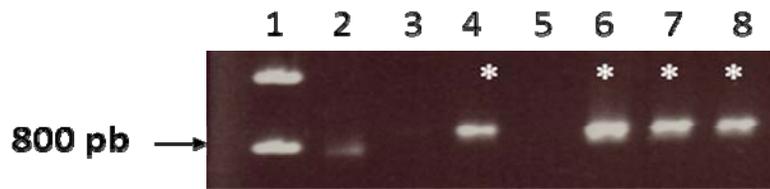


Figura 9. Electroforesis en gel de TAE-agarosa 1.5x con tinción de bromuro de etidio e iluminación con luz UV de cinco colonias infectadas con la biblioteca de scFv de humano no inmune. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular. El carril 2 representa el control de PCR. Los carriles 4-8 representan el DNA de fagos de la biblioteca de scFv. El asterisco (\*) de los carriles 4, 6, 7 y 8 corresponden a la clonas con el inserto del tamaño adecuado ( $\approx 800$  pb).

Se hizo una segunda ronda de bioselección de scFv anti-A $\beta$  como se describió anteriormente. Se picaron al azar 5 clonas y se analizaron. De las 5 clonas seleccionadas, 3 tuvieron el tamaño de inserto adecuado ( $\approx 800$  pb), lo cual corresponde al 60% (Figura 10).

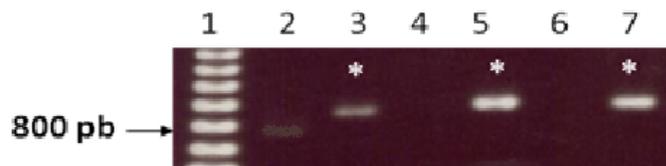


Figura 10. Electroforesis en gel de TAE-agarosa 1.5x con tinción de bromuro de etidio e iluminación con luz UV de cinco colonias infectadas con la biblioteca de scFv de humano no inmune. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular. El carril 2 representa el control de PCR. Los carriles 3-7 representan el DNA de fagos de la biblioteca de sFv. El asterisco (\*) de los carriles 5 y 7 corresponden a la clonas con el inserto del tamaño adecuado ( $\approx 800$  pb).

Se realizó una tercera ronda de bioselección como se describió anteriormente, se picaron al azar 20 clonas y se analizaron. De las 20 clonas seleccionadas, 10 clonas tuvieron el tamaño de inserto adecuado, lo cual corresponde al 50% (Figura 11).

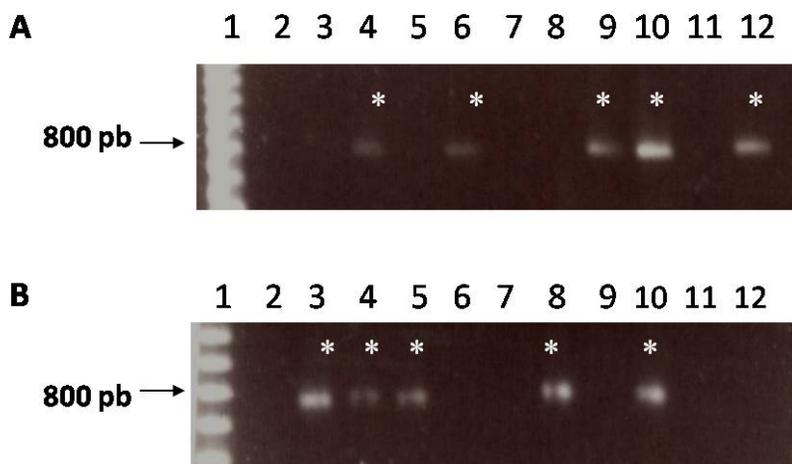


Figura 11. Electroforesis en gel de TAE-agarosa 1.5x con tinción de bromuro de etidio e iluminación con luz UV de veinte colonias infectadas con la biblioteca de scFv de humano no inmune (A y B). El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular. Los carriles 3-12 representan el DNA de fagos de la biblioteca de scFv. El asterisco (\*) de los carriles corresponden a la clonas con el inserto del tamaño adecuado ( $\approx 800$  pb).

Después de una cuarta ronda de bioselección, se picaron al azar 20 clonas y se analizaron. De las 20 clonas seleccionadas, 8 clonas tuvieron el tamaño de inserto adecuado, lo cual corresponde al 40% (Figura 12).



Figura 12. Electroforesis en gel de TAE-agarosa 1.5x con tinción de bromuro de etidio e iluminación con luz UV de veinte colonias infectadas con la biblioteca de scFv de humano no inmune. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular. Los carriles 2, 4 y 5 corresponden a controles de PCR. Los carriles 6-25 representan el DNA de fagos de la biblioteca de scFv. El asterisco (\*) de los carriles 8, 9, 10, 11, 13, 15, 18 y 20 corresponden a la clonas con el inserto del tamaño adecuado ( $\approx 800$  pb).

## ELISA DE LAS CLONAS DE scFv Y VH DE RATÓN INMUNE DE LA PRIMERA Y SEGUNDA RONDA DE BIOSELECCIÓN

Mediante un ensayo de ELISA se identificaron clonas reactivas al péptido  $A\beta_{42}$  fibrilar a partir de la primera y segunda ronda de bioselección de las bibliotecas de scFv y VH de ratón inmune anti- $A\beta_{42}$  fibrilar. Para dicho ensayo se probaron las clonas amplificadas con los títulos homologados a  $10^{11}$  ufc/ml, utilizando el péptido  $A\beta_{42}$  fibrilar inmovilizado en la placa.

Las clonas que tuvieron el tamaño adecuado fueron evaluadas mediante este ensayo de ELISA. Se eligieron para su posterior evaluación a las clonas que presentaron una DO tres veces o más por encima de la del control negativo M13, después de tres

réplicas. Con este criterio se obtuvieron dos clonas de scFv de ratón inmune (clona 1.6 y clona 1.10) (Figura 13). Debido a que no mantuvieron su reactividad al péptido A $\beta$ <sub>42</sub> en ensayos de ELISA posteriores, no se continuó con la evaluación de la capacidad neuroprotectora de los scFv de la biblioteca de ratón inmune.

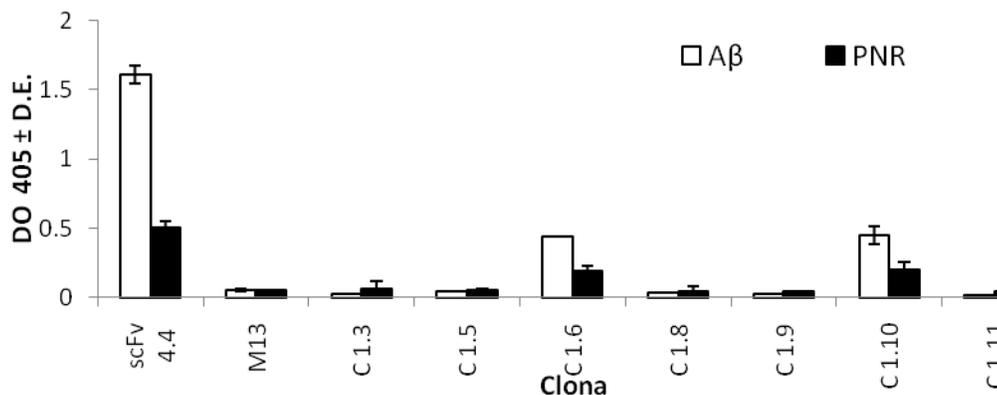


Figura 13. Análisis por ELISA de la unión de las clonas de scFv de ratón inmune seleccionadas al péptido A $\beta$ <sub>42</sub> fibrilar y a un péptido no relacionado (PNR) como control. Se utilizó un scFv anti-A $\beta$ <sub>42</sub> como control positivo (scFv 4.4) y M13 silvestre como control negativo. Los datos que se expresan como media  $\pm$  D.E. son el resultado de tres experimentos independientes.

De la biblioteca de VH de ratón inmune se obtuvieron tres clonas reactivas (C1.27, C1.28 y C2.8) (Figura 14), las cuales fueron evaluadas en los ensayos de neuroprotección *in vitro* con células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y).

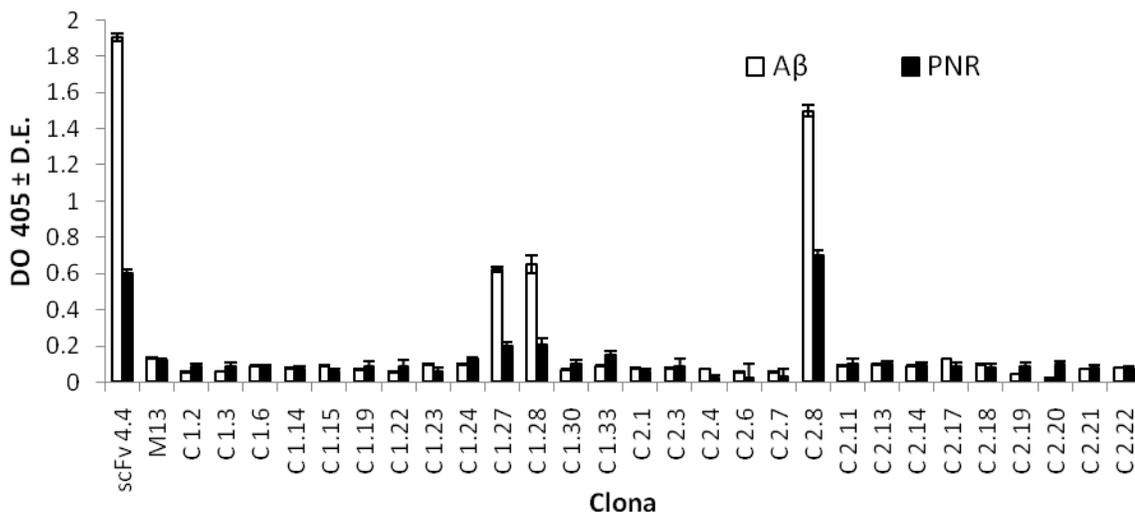


Figura 14. Análisis por ELISA de la unión de las clonas de VH de ratón inmune seleccionadas al péptido A $\beta$ <sub>42</sub> fibrilar y a un péptido no relacionado (PNR) como control. Se utilizó un scFv anti-A $\beta$ <sub>42</sub> como control positivo (scFv 4.4) y M13 silvestre como control negativo. Los datos que se expresan como media  $\pm$  D.E. son el resultado de tres experimentos independientes.

## ELISA DE LAS CLONAS DE scFv DE HUMANO NO INMUNE DE LA TERCERA Y CUARTA RONDA DE BIOSELECCIÓN

Se identificaron clonas reactivas a ADDLs a partir de la tercera y cuarta ronda de bioselección de la biblioteca de scFv de humano no inmune en un ensayo de ELISA. Se probaron las clonas amplificadas con el tamaño de inserto adecuado con los títulos homologados a  $10^{11}$  ufc/ml. Se utilizó el péptido  $A\beta_{42}$  soluble (ADDLs) inmovilizado en la placa a 2  $\mu$ g/ml en amortiguador de carbonatos.

De este ensayo se obtuvieron dos clonas reactivas (scFv 3.20 y scFv 4.8) cuya DO se encontraba por encima del control negativo al menos por tres veces (Figura 15). Las clonas 3.20 y 4.8, mostraron alta reactividad al péptido, por lo cual fueron evaluadas en ensayos de neuroprotección *in vitro* con células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y).

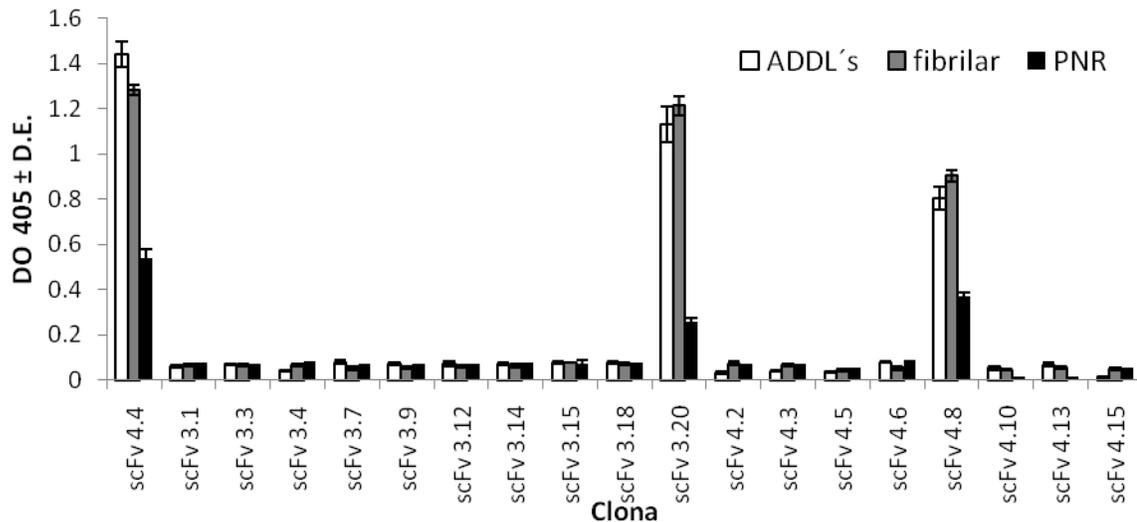


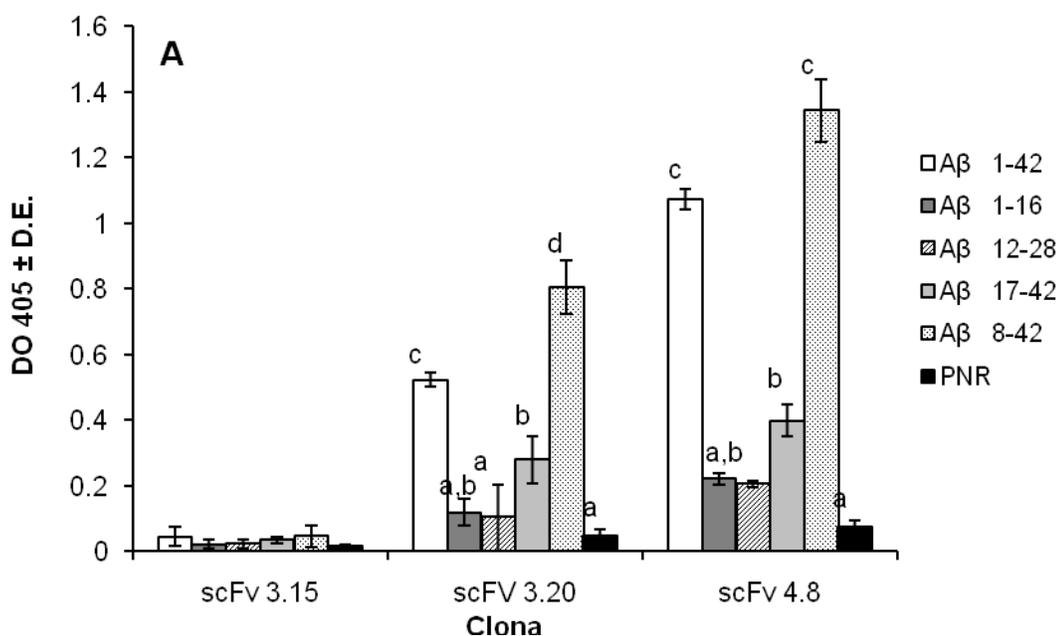
Figura 15. Análisis por ELISA de la unión de las clonas de scFv de humano no inmune seleccionadas a ADDLs, al péptido  $A\beta_{42}$  fibrilar y a un péptido no relacionado (PNR) como control. Se utilizó un scFv anti- $A\beta_{42}$  como control positivo (scFv 4.4). Los datos que se expresan como media  $\pm$  D.E. son el resultado de tres experimentos independientes.

## MAPEO DE EPÍTOPOS DE LAS CLONAS POSITIVAS DE scFv Y VH USANDO FRAGMENTOS DEL $A\beta_{42}$

Para determinar cuál es la región del péptido  $A\beta$  reconocida por cada una de las clonas, se realizó un ensayo de ELISA con fragmentos del péptido  $A\beta$  ( $A\beta_{1-16}$ ,  $A\beta_{12-28}$ ,  $A\beta_{17-42}$  y  $A\beta_{8-42}$ ), para todas las clonas seleccionadas (scFv 3.20, scFv 4.8, VH 1.27, VH 1.28 y VH 2.8).

Una ventaja de la generación de bibliotecas de VH o scFv anti-A $\beta_{42}$ , es la posibilidad de seleccionar anticuerpos con cierta especificidad. Por ejemplo, en un estudio previo (Pfeifer et al, 2002), se observó que después de la inmunización pasiva de ratones transgénicos (APP23), con un anticuerpo monoclonal específico para la región N-terminal del péptido A $\beta$ , se presentaron microhemorragias.

Uno de los hallazgos del presente estudio, es que ninguna de las clonas seleccionadas (VH de ratón inmune o scFv de humano no inmune), reconocieron la región N-terminal del péptido A $\beta$  (fragmentos A $\beta_{1-16}$  y A $\beta_{12-28}$ ), como se muestra en la Figura 16 (A y B). Se encontró que las clonas están dirigidas del centro al extremo C-terminal del péptido A $\beta$ .



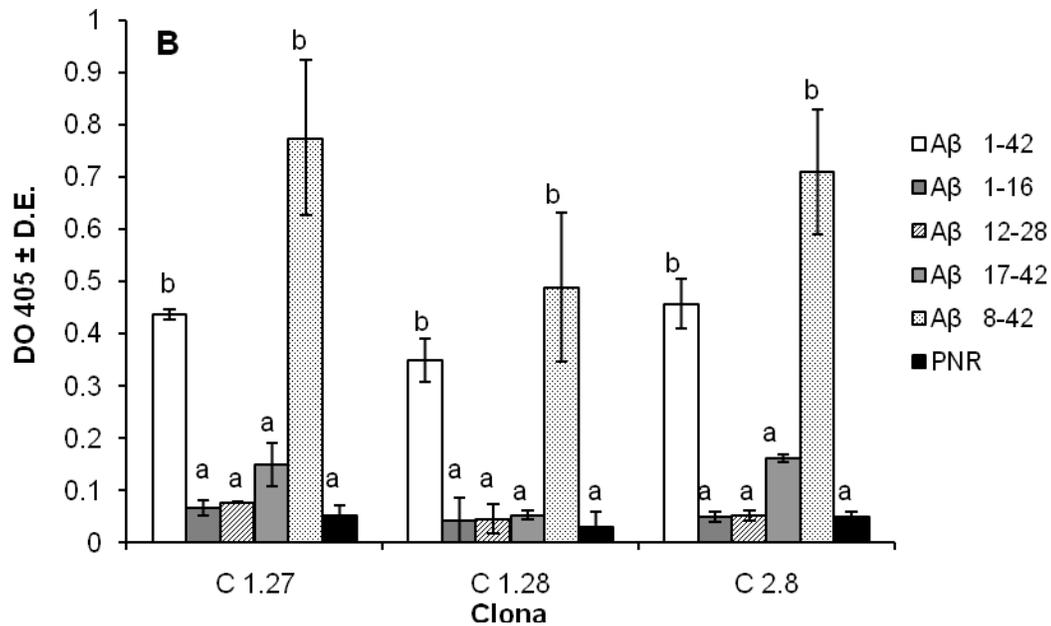


Figura 16. Mapeo de las clonas positivas de scFv de humano no inmune (A) y VH de ratón inmune (B) utilizando péptidos truncados del A $\beta$ <sub>42</sub> y un péptido no relacionado. El control negativo es la clona de scFv 3.15 y el control positivo es la clona de scFv 4.4. Los datos que se expresan como media  $\pm$  D.E. son el resultado de dos experimentos independientes. Las medias señaladas con diferentes letras son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

## ENSAYOS DE NEUROTOXICIDAD MEDIADA POR ADDLS EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO (SH-SY5Y)

Con el fin de caracterizar la capacidad de las clonas de scFv y VH de inhibir la neurotoxicidad por ADDLs en las células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), se determinó la concentración de ADDLs que induce neurotoxicidad. En la Figura 17 se muestran los resultados de tres experimentos de neurotoxicidad con ADDLs a 10 y 20  $\mu$ M en células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y). Para dichos resultados se cuantificó la citotoxicidad con el ensayo de XTT. La lectura de la DO a 500 nm fue registrada usando el lector de microplacas Opsys Mr (Dynex Tech, Chantilly, VA, USA).

Las células tratadas con ADDLs a 10  $\mu$ M y 20  $\mu$ M muestran alrededor de 10.7 y 23.4% de mortalidad respectivamente. El DMSO es el vehículo presente en todos los tratamientos (células control). Los controles negativos son el péptido A $\beta$ <sub>42-1</sub> y el A $\beta$ <sub>35-25</sub>, que no son tóxicos para las células. El control positivo es la camptotecina (15  $\mu$ M), un inductor de apoptosis.

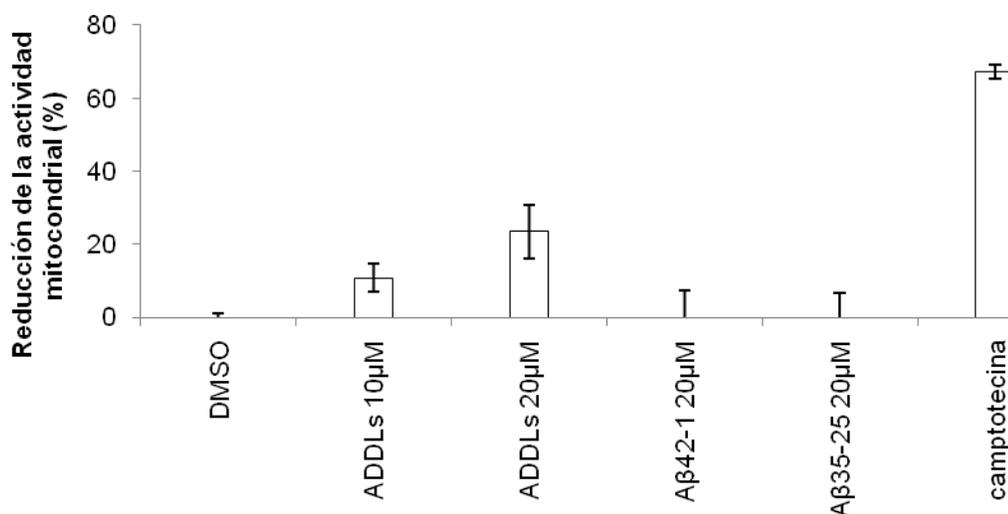


Figura 17. Efecto de los ADDLs a dos concentraciones (10 y 20  $\mu\text{M}$ ) en las células de neuroblastoma de humano SH-SY5Y con respecto a las células control (DMSO). Se determinó la citotoxicidad por la reducción del XTT. Los datos se expresan como media  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes.

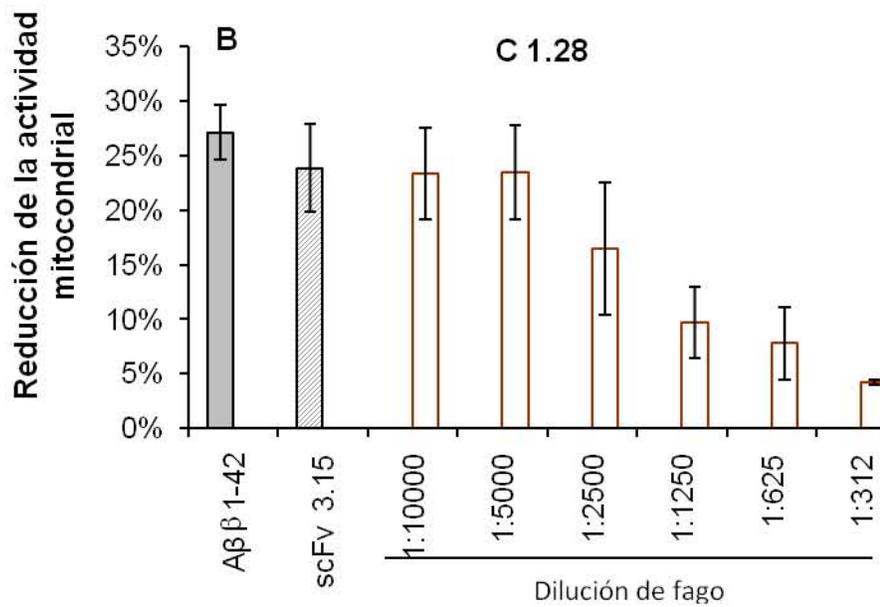
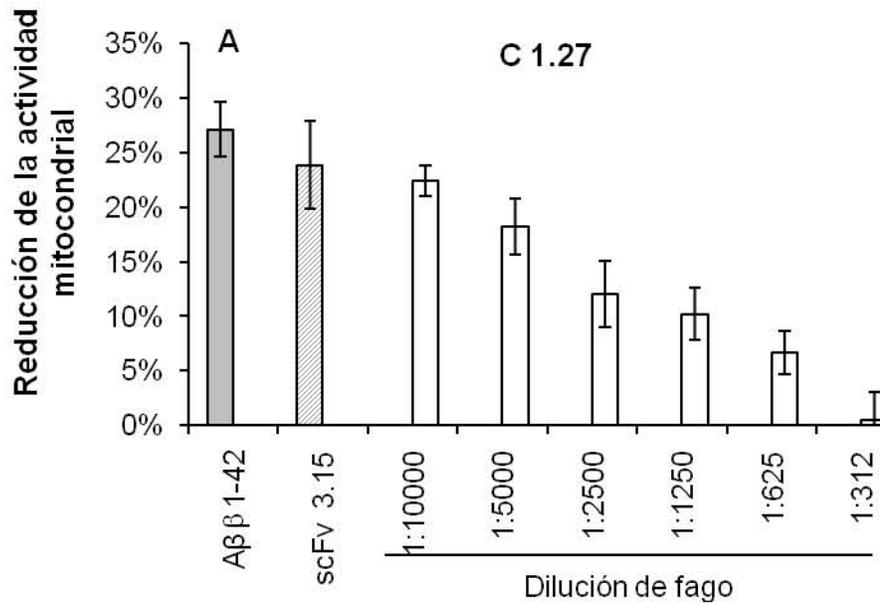
## ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LA NEUROTOXICIDAD MEDIADA POR ADDLS EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO (SH-SY5Y), POR LAS CLONAS POSITIVAS DE VH DESPLEGADAS EN FAGO

Se midió la citotoxicidad mediada por ADDLs sólo o en combinación con las clonas de VH de ratón inmune (en alta copia) a diferentes concentraciones. Cada una de las clonas seleccionadas, fueron preincubadas por 24 hrs. con los ADDLs a 4°C. Posteriormente, la mezcla se adicionó a las células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y). Al término de una incubación de 24 hrs. de los tratamientos con las células, se midió la viabilidad celular, mediante la cuantificación de la actividad redox con el kit de XTT.

En la Figura 18 se presenta el resultado de un experimento representativo (Figura 18 A), en el cual, las células SH-SY5Y fueron incubadas con ADDLs (20  $\mu\text{M}$ ) y la clona de VH, C 1.27, seleccionada a partir de una biblioteca de ratón inmune. Este experimento se llevó a cabo a concentraciones molares crecientes de la clona (a una relación molar fago: ADDLs de 1:10000, 1:5000, 1:2500, 1:1250, 1:625 y 1:312.5), manteniendo constante la concentración de ADDLs (20  $\mu\text{M}$ ). La clona C 1.27, con la relación molar de 1:312 de fago, inhibió totalmente la toxicidad de los ADDLs.

Del mismo modo, se midió la citotoxicidad mediada por ADDLs (20  $\mu\text{M}$ ) sólo o en combinación con una clona de VH (en alta copia). Se determinó que la relación molar

fago:ADDLs necesaria para inhibir el efecto tóxico de los ADDLs para la clona C 1.28 fue de 1:312 molar (Figura 18 B) y para la clona C 2.8 fue de 1:625 (Figura 18 C).



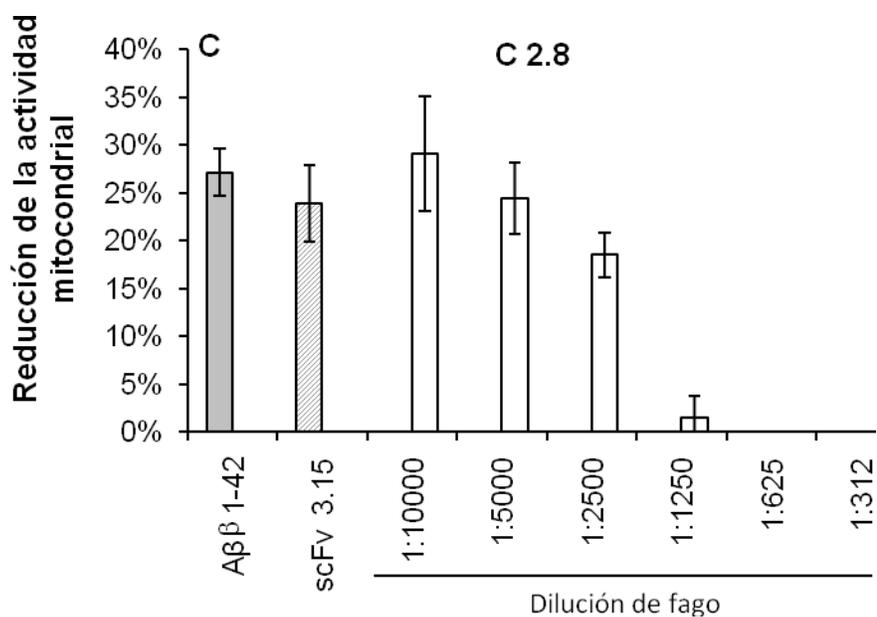


Figura 18. Inhibición de la neurotoxicidad inducida por los ADDLs por la presencia de las clonas de VH de ratón inmune desplegadas en fago a diferentes concentraciones crecientes en las células SH-SY5Y, determinado por la reducción del XTT. Los datos se expresan como media  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes.

## ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LA NEUROTOXICIDAD MEDIADA POR ADDLS EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO (SH-SY5Y), POR CLONAS DE scFv DESPLEGADAS EN FAGO

De la misma manera, a continuación se presentan los resultados de tres experimentos (Figura 19), en el cual, las células SH-SY5Y fueron incubadas con ADDLs y las clonas de scFv seleccionadas a partir de una biblioteca de scFv de humano no inmune (*naïve*). La clona scFv 3.20 (Figura 19 A) fue evaluada a concentraciones crecientes (a una relación molar fago: ADDLs de 1:10000, 1:5000, 1:2500, 1:1250 y 1:625), al igual que una clona de scFv como control positivo (4.4). En el caso de la clona scFv 3.20, con la relación molar de fago:ADDLs 1:1250, inhibió totalmente la toxicidad de los ADDLs. La clona scFv 4.4, con la relación molar de fago: ADDLs 1:625 (dato no mostrado), inhibió totalmente la toxicidad de los ADDLs.

Bajo el mismo diseño experimental, la clona scFv 4.8 previene la toxicidad mediada por ADDLs en la relación molar fago:ADDLs 1:625 (Figura 19 B).

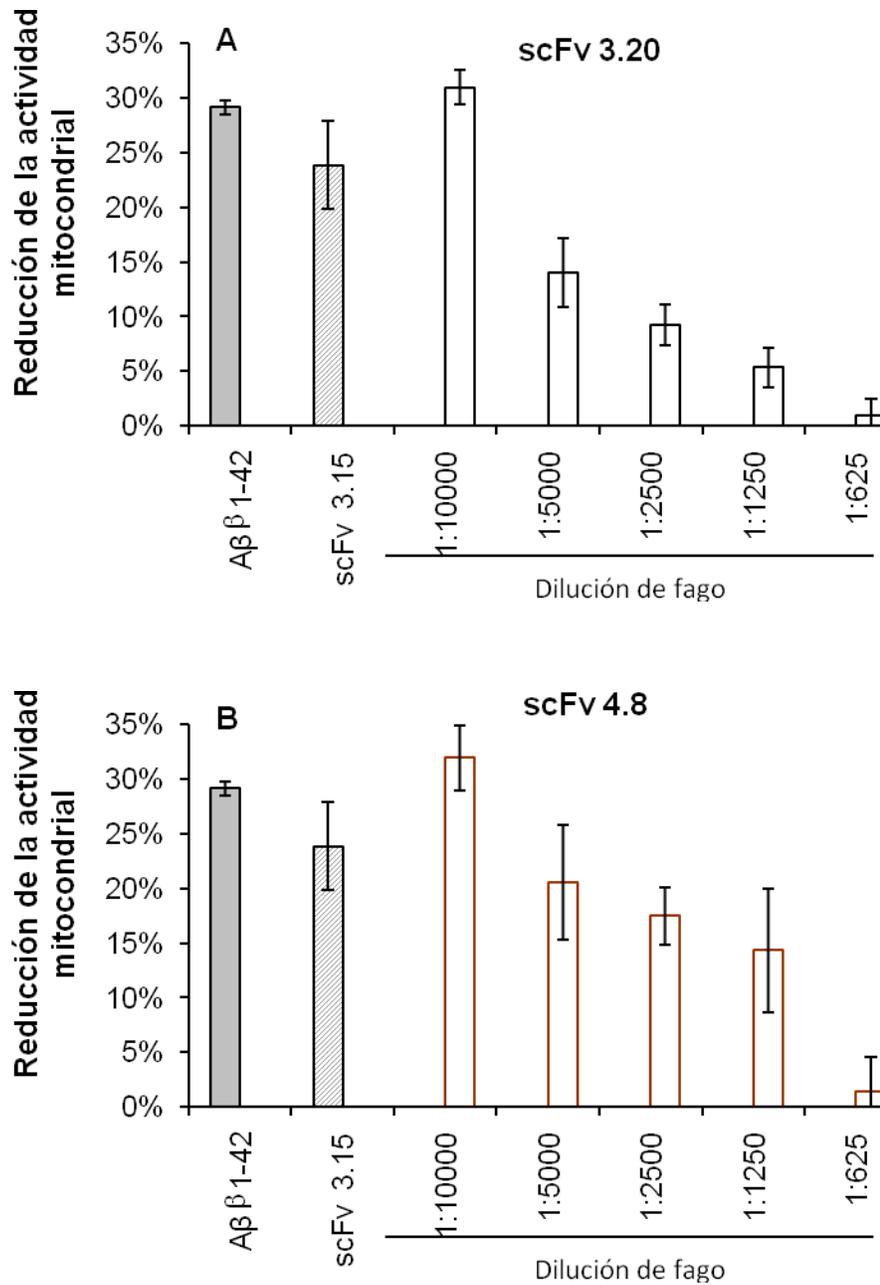


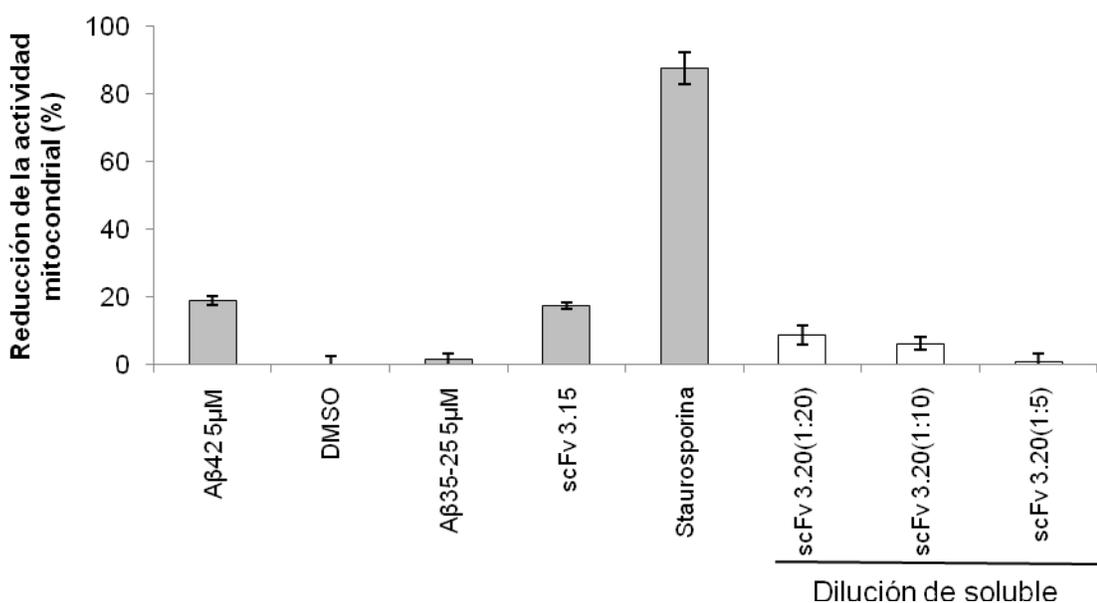
Figura 19. Inhibición de la neurotoxicidad inducida por los ADDLs por la presencia de las clonas de scFv de humano no inmune desplegadas en fago a diferentes concentraciones crecientes en las células SH-SY5Y, determinado por la reducción del XTT. Los datos se expresan como media  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes.

## ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA TOXICIDAD MEDIADA POR ADDLS EN PRESENCIA DE LAS CLONAS DE scFv DE HUMANO SOLUBLES EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA (SH-SY5Y)

Se midió la citotoxicidad mediada por ADDLs sólo o en combinación con las clonas seleccionadas por su reactividad a ADDLs de los scFv de humano no inmune solubles a diferentes concentraciones. Las clonas seleccionadas, fueron preincubadas por 24 hrs. con los ADDLs a 4°C. Posteriormente, esta mezcla se adicionó a las células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) por 24 h a 37°C. Al término de 24 hrs. se midió la viabilidad celular, mediante la cuantificación de la actividad redox con XTT (Figura 20).

Cada una de las clonas fue evaluada a diferentes concentraciones crecientes (a una relación molar de scFv:ADDLs 1:20, 1:10 y 1:5. Se mantuvo constante la concentración de ADDLs (5 µM). En el caso de la clona scFv 3.20 y scFv 4.4 se inhibió totalmente la toxicidad inducida por los ADDLs, con la relación molar 1:5. Mientras que en la clona scFv 4.8 se inhibió totalmente la toxicidad inducida por los ADDLs, con la relación molar de 1:20 del scFv.

A



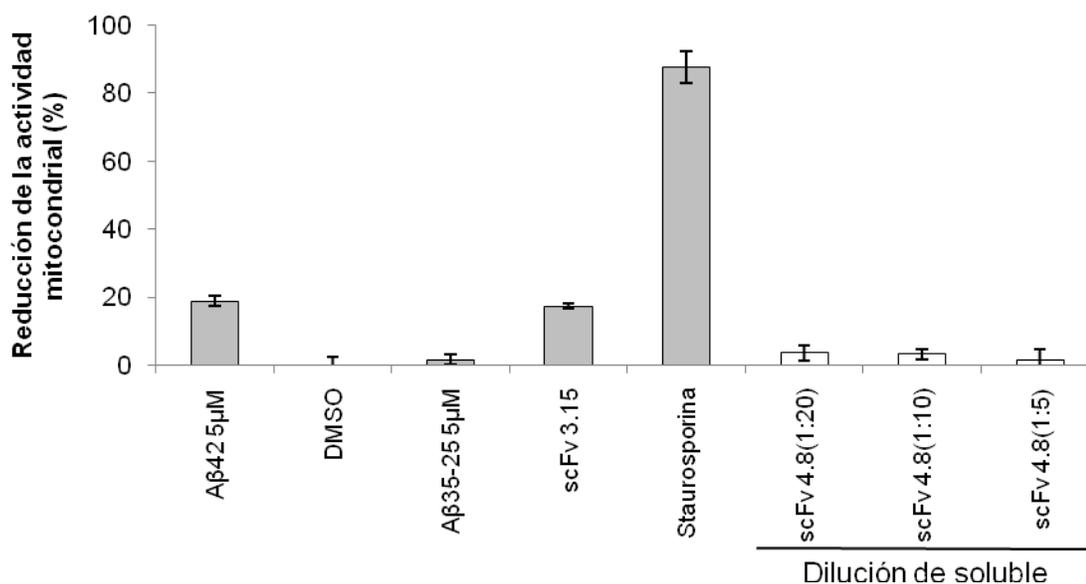
**B**

Figura 20. Inhibición de la neurotoxicidad producida por los ADDLs ante la presencia de las clonas de scFv de humano no inmune solubles a diferentes concentraciones crecientes en las células SH-SY5Y, determinada por la reducción del XTT. Los datos se expresan como media  $\pm$  D.E. de tres experimentos independientes.

## INMUNOHISTOQUÍMICA DE SECCIONES CORONALES DE CEREBROS DE RATONES wt Y Tg2576 CON scFv SOLUBLES

La presencia de placas neuríticas o seniles, formadas principalmente por depósitos extracelulares del péptido A $\beta$  fibrilar, es uno de los dos marcadores empleados para el diagnóstico de la EA y se encuentran presentes en áreas de la corteza cerebral e hipocampo.

Se emplearon los scFv solubles purificados (4.4, 3.15, 3.20 y 4.8) para teñir cortes coronales de cerebros de ratones transgénicos de la EA (Tg2576) y wt con DAB (Figura 21). La línea de ratones transgénicos Tg2576 sobreexpresa la APP con la doble mutación sueca KM670/671NL bajo el control del promotor de la proteína del prión en una cepa híbrida C57B6 x SJL. Estos animales desarrollan con la edad, déficit de memoria y aprendizaje asociados a la aparición de placas amiloides en áreas límbicas y corticales que se inicia en torno al año de edad (Hsiao et al, 1996).

Con esta técnica fue posible apreciar los depósitos de agregados del péptido A $\beta$ , al ser reconocidos por las clonas positivas de scFv solubles. En la Figura 21 se muestran las imágenes donde se observó la inmunotinción en el hipocampo de los cortes de cerebro de los ratones transgénicos de la EA (Tg2576) y no así en los cortes

cerebrales de los ratones wt, empleando las clonas positivas de scFv solubles (3.20, 4.4 y 4.8).

No se encontró tinción en el caso de la clona negativa, tanto en los cortes de ratones transgénicos, como en el caso de los ratones wt.

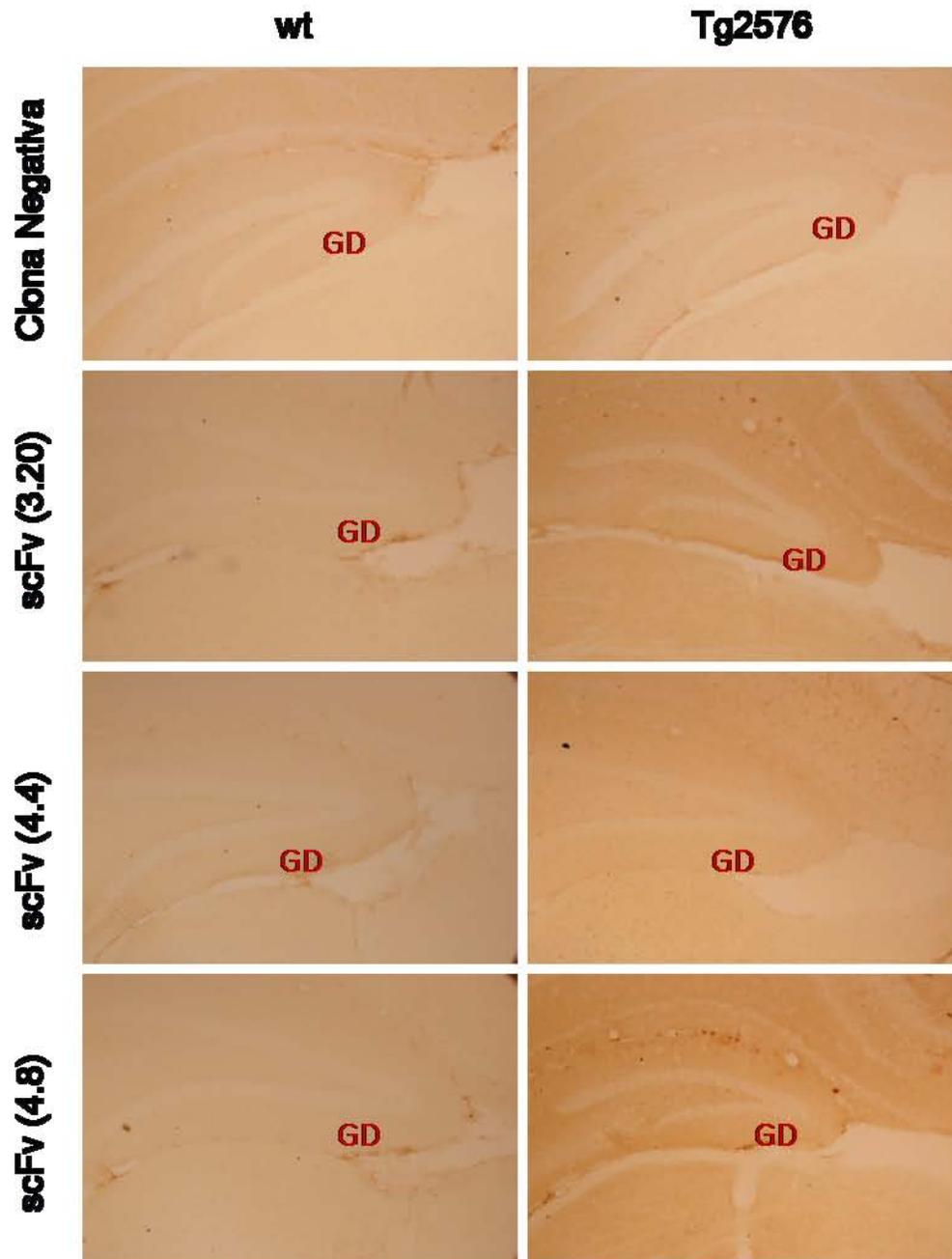


Figura 21. Análisis de la inmunoreactividad de los scFv positivos solubles purificados (clona negativa, scFv 3.20, scFv 4.4, y scFv 4.8), hacia depósitos del péptido A $\beta$  mediante inmunohistoquímica de cortes coronales a nivel de hipocampo de ratón wt y Tg2576. GD: Giro Dental del hipocampo. Los cortes fueron teñidos con diaminobencidina.

## **INMUNOFLUORESCENCIA DE SECCIONES CORONALES DE CEREBROS DE RATONES wt Y Tg2576 EMPLEANDO scFv Y VH SOLUBLES**

### **INMUNOFLUORESCENCIA DE SECCIONES CORONALES DE CEREBROS DE RATÓN EMPLEANDO scFv Y VH SOLUBLES Y THIOFLAVINA T**

Con el objeto de caracterizar las propiedades de unión de los fragmentos de anticuerpo seleccionados, se emplearon los scFv y VH solubles para el análisis por microscopía confocal de cortes coronales de cerebros de ratones wt y el mismo modelo murino de la EA (Tg2576), que presenta agregados naturales del péptido A $\beta$ . Se marcaron las placas amiloides con thioflavina T (verde) y los scFv y VH en rojo (TRITC) (Figura 22 y 23).

Con esta técnica se definieron depósitos del péptido A $\beta$  como placas, con un centro denso y la periferia difusa, las placas fueron reactivas tanto para la tinción con thioflavina T, como para los scFv y VH positivos, en los cortes de cerebros de ratones transgénicos Tg2576.

El empleo de thioflavina T, permitió teñir material fibrilar amiloide, como es el caso de las placas neuríticas, que están constituidas por el péptido A $\beta_{40}$  y A $\beta_{42}$ . Con esta tinción fue posible apreciar las placas neuríticas con un centro denso estrellado, que representa el mismo patrón de tinción con la clona scFv 3.20. En el caso de las clonas scFv 4.4 y scFv 4.8 se observó una tinción importante en la periferia de las placas, no en el centro de éstas, lo que sugiere una mayor reacción a los oligómeros de las placas y no a las fibrillas densas del centro de éstas, siendo más evidente para el caso de la clona scFv 4.8 (Figura 22). No se encontró tinción, ni con thioflavina T, ni con los scFv en los cortes de cerebros de ratones wt (dato no mostrado).

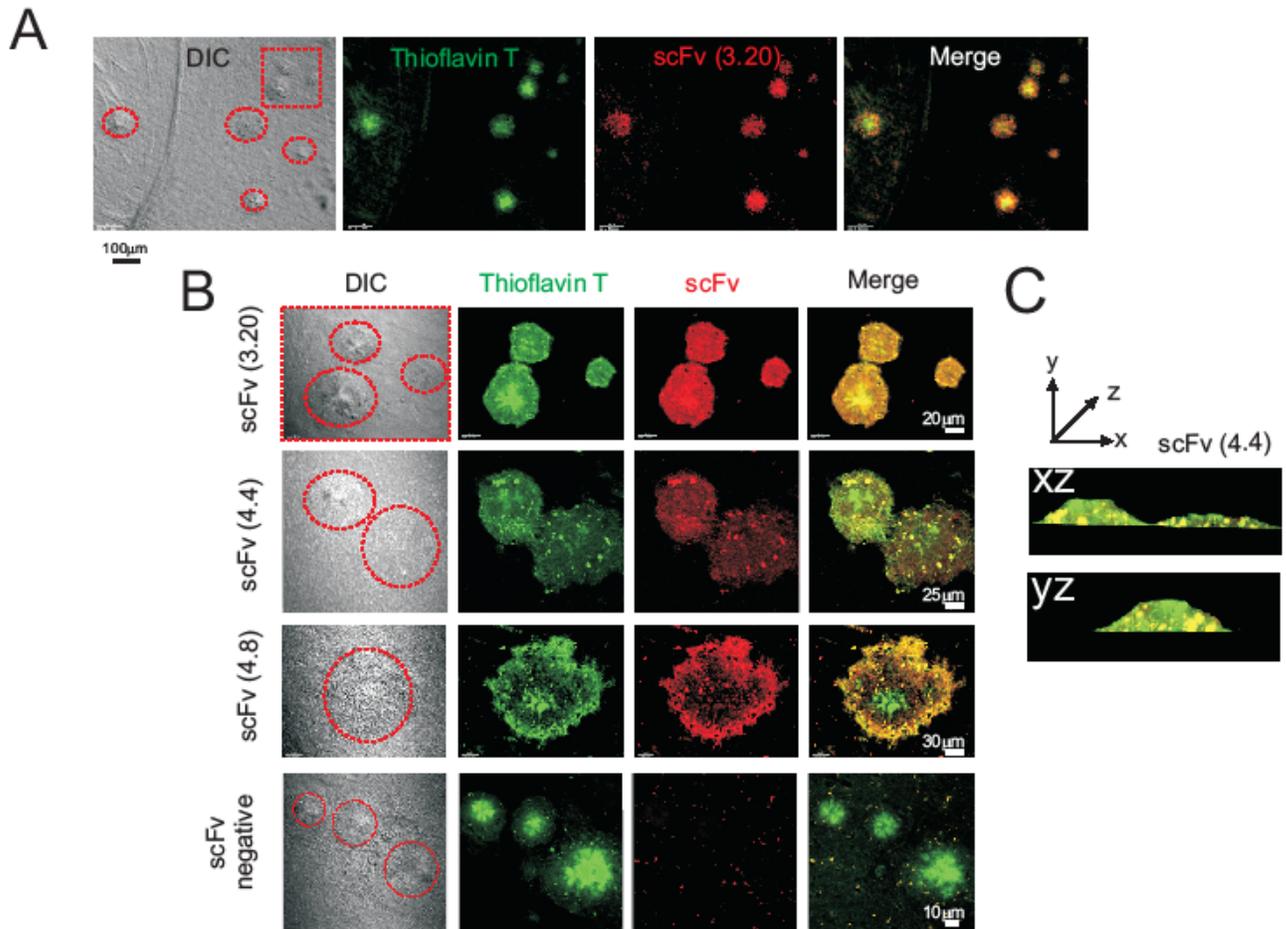


Figura 22. Análisis con microscopía confocal de cortes coronales de cerebros de ratón Tg2576 a nivel de hipocampo, con scFv solubles purificados (A, B y C). Anticuerpos scFv solubles seleccionadas de una biblioteca de humano no inmune desplegadas en fago (clona negativa, scFv 4.4, scFv 3.20 y scFv 4.8), reconocen depósitos del péptido A $\beta$  en el hipocampo de ratones transgénicos (Tg2576). (A) Aumento bajo donde se muestra el reconocimiento del scFv 3.20 hacia los depósitos del péptido A $\beta$ . (B) Aumento alto que muestra con mayor detalle, la unión de los scFv a los depósitos del péptido A $\beta$ . El panel de la izquierda muestra la tinción de los depósitos del péptido A $\beta$  con Thioflavina T (verde); en el centro se observa la reactividad de los fragmentos de anticuerpo scFv solubles (rojo); el panel a la derecha muestra la fusión de los canales en rojo y verde, es decir, la colocalización de la fluorescencia verde y roja (amarillo).

Con el objeto de caracterizar las propiedades de unión de las clonas positivas de VH solubles seleccionadas, se realizó el análisis por microscopía confocal de cortes coronales de cerebros de ratones wt y el mismo modelo murino de la EA (Tg2576). Se realizaron dos tinciones: una con thioflavina T (verde), que permitió teñir material fibrilar amiloide, como es el caso de las placas neuríticas, que están constituidas por el péptido A $\beta_{40}$  y A $\beta_{42}$ . La otra con TRITC, que tiñó de color rojo a los VHs solubles. En el caso de las clonas positivas de VH (VH 1.27, VH 1.28 y VH 2.8) se observó una tinción importante en la periferia de las placas, no en el centro de éstas, y como se mencionó anteriormente, esto sugiere una mayor inmunoreacción a los oligómeros de las placas y no a las fibrillas densas del centro de éstas (Figura 23). No se encontró

tinción, ni con thioflavina T, ni con los VH en los cortes de cerebros de ratones wt (dato no mostrado).

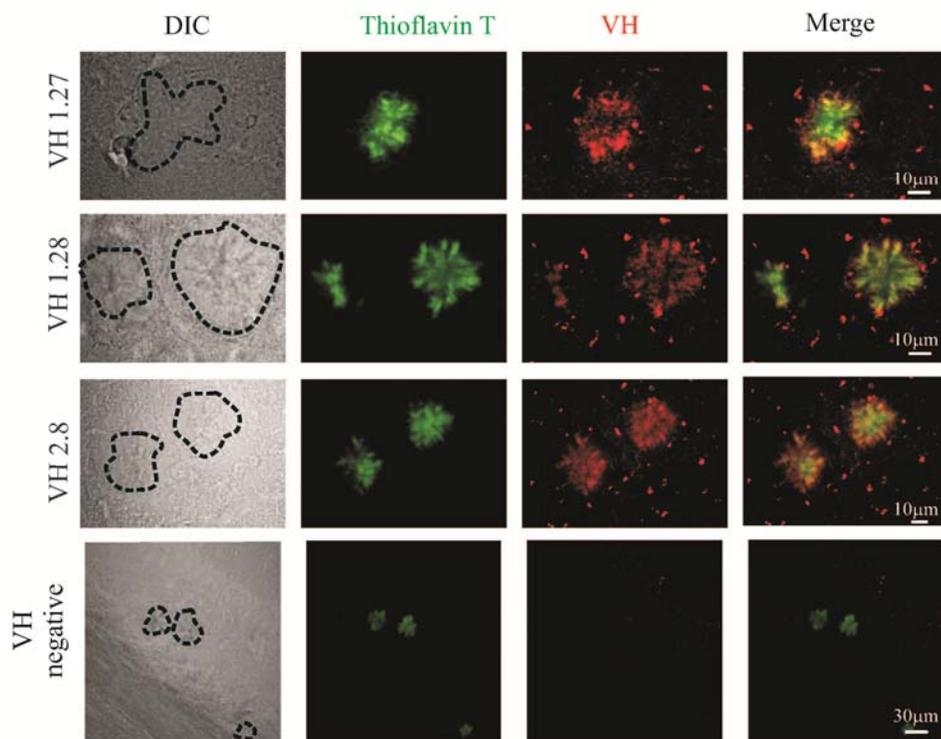


Figura 23. Análisis con microscopía confocal de cortes coronales de cerebros de ratón Tg2576 a nivel de hipocampo, con VH solubles purificados. Los fragmentos de anticuerpos VH solubles seleccionados de una biblioteca de ratón inmune (clona negativa, VH 1.27, VH 1.28 y VH 2.8), reconocen depósitos del péptido A $\beta$  en el hipocampo de ratones transgénicos (Tg2576). El panel de la izquierda muestra la tinción de depósitos del péptido A $\beta$  con Thioflavina T (verde); en el centro se observa la reactividad de los fragmentos de anticuerpo VH solubles (rojo); el panel a la derecha muestra la fusión de los canales en rojo y verde, es decir, la colocalización de la fluorescencia verde y roja (amarillo).

## INMUNOFLOURESCENCIA DE SECCIONES CORONALES DE CEREBROS DE RATONES WT Y TG2576 EMPLEANDO UN ANTICUERPO ANTI-A $\beta_{42}$ DE CONEJO Y scFv SOLUBLES

Además se emplearon los scFv solubles (verde, Alexa-Fluor 488, Invitrogen, USA) para el análisis por microscopía confocal de cortes coronales de ratones wt y el mismo modelo murino de la EA (Tg2576), con una segunda tinción empleando un anticuerpo de conejo anti-A $\beta_{42}$  y (rojo, Alexa-Fluor 594 goat anti-rabbit, Invitrogen, USA).

Con todas las clonas positivas se observó reactividad (verde) de los depósitos amiloides en las placas neuríticas de los cortes de cerebros de ratones transgénicos (Tg2576) (Figura 24), con excepción en los cortes de cerebro de ratones wt (dato no mostrado). Para el caso del anticuerpo de conejo anti-A $\beta_{42}$  también se observó

reactividad en las placas neuríticas en los cortes del cerebro de ratones Tg2576, con excepción de los cortes de cerebro de ratones wt.

Los patrones de inmunoreactividad de los scFv anti-A $\beta$  fueron mayores en la periferia de las placas y no en el corazón de ellas. Como se mencionó anteriormente, esto sugiere una mayor reacción hacia los oligómeros del péptido A $\beta$  y no a las fibrillas densas del centro de las placas neuríticas.

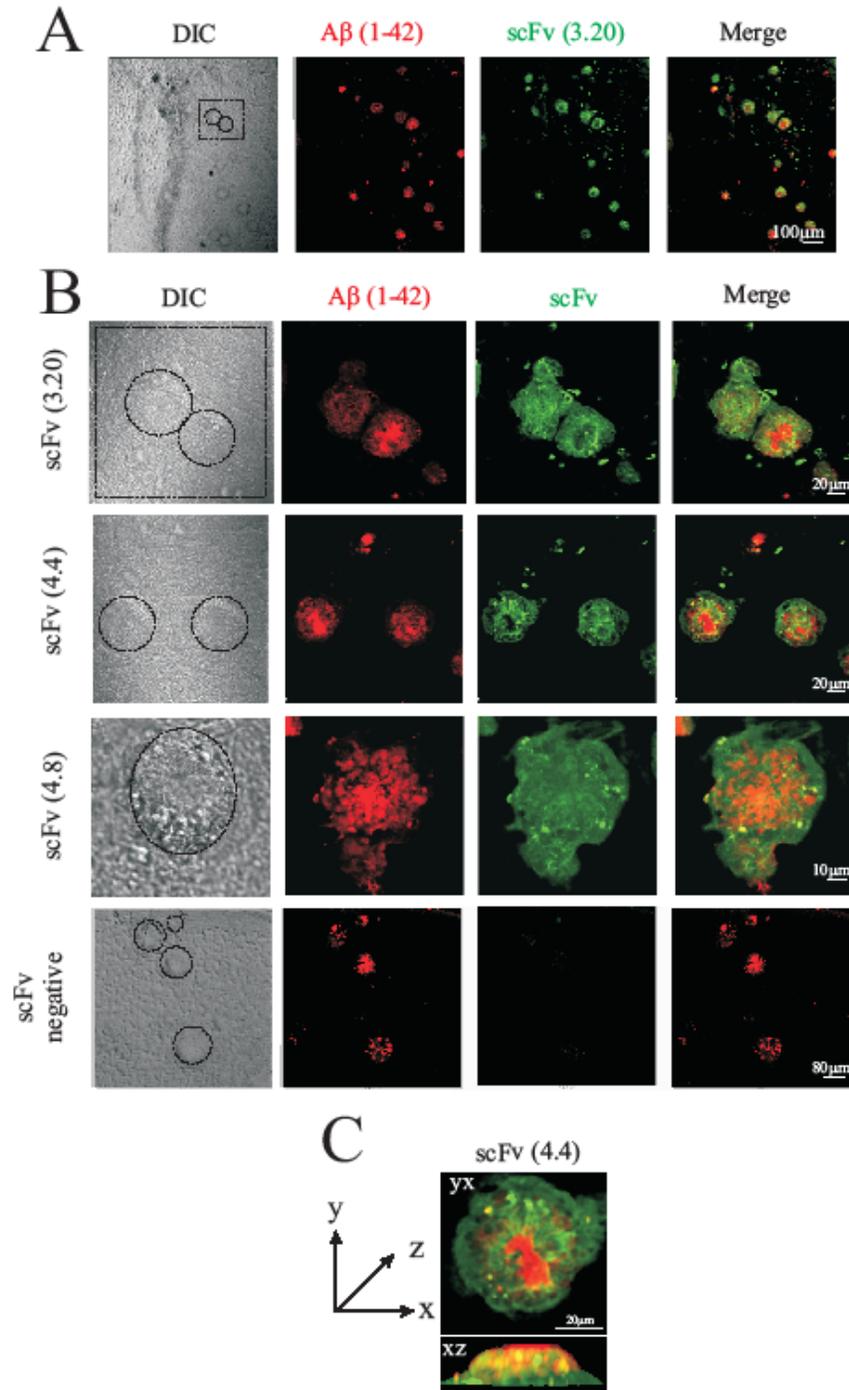


Figura 24. Análisis con microscopía confocal de cortes coronales de cerebros de ratón Tg2576 a nivel de hipocampo, con scFv solubles purificados (A, B y C). Fragmentos de anticuerpos scFv solubles de una biblioteca de humano no inmune (clona negativa, scFv 3.20 y scFv 4.8), reconocen depósitos del péptido A $\beta$  en el hipocampo de ratones transgénicos (Tg2576). (A) Aumento bajo donde se muestra el reconocimiento de un anticuerpo anti-A $\beta$  control (rojo) y del scFv 3.20 hacia los depósitos del péptido A $\beta$ . (B) Aumento alto que muestra con mayor detalle, la unión de los scFv a los depósitos del péptido A $\beta$ . El panel de la izquierda muestra la tinción de depósitos del péptido A $\beta$  con un anticuerpo anti-A $\beta$  (rojo); en el centro se observa la reactividad de los fragmentos de anticuerpo scFv solubles (verde); el panel a la derecha muestra la fusión de los canales en rojo y verde, es decir, la colocalización de la fluorescencia verde y roja (amarillo).

## DISCUSIÓN

En este estudio se seleccionaron, a partir de bibliotecas de fragmentos de anticuerpos, anticuerpos recombinantes en los formatos de scFv y VH. Los VH son fragmentos variables de cadena pesada de inmunoglobulinas y los scFv son anticuerpos de cadena sencilla del fragmento variable de las inmunoglobulinas. Se evaluaron las características de unión al péptido A $\beta$ <sub>42</sub>, así como su capacidad para inhibir la toxicidad del péptido A $\beta$ <sub>42</sub> *in vitro*, en una línea celular de neuroblastoma de humano SH-SY5Y. Por otro lado, se demostró que estos anticuerpos recombinantes se unen al péptido A $\beta$ <sub>42</sub> presente en cerebros de ratones transgénicos.

La inmunoterapia, tanto activa como pasiva, ha mostrado efectividad en diferentes modelos murinos de la EA (Brody et al, 2008), caninos y primates (Lemere et al, 2004; Head et al, 2008). Sin embargo, existen casos de efectos secundarios como inflamación y microhemorragias. Una rápida respuesta de la microglía alrededor de la patología amiloide e interacciones de la microglía vía receptor Fc con anticuerpos completos en la opsonización del amiloide, ha mostrado un incremento en el proceso de inflamación (Lue et al, 2002; Koenigsnecht-Talboo et al, 2008). Sin embargo en un estudio del grupo de Morgan (2006), se observaron efectos secundarios vasculares mínimos después de la administración pasiva de anticuerpos anti-A $\beta$  desglucosilados en comparación con anticuerpos anti-A $\beta$  completos (Wilcock et al, 2006). La desglucosilación de IgG resulta en la unión deficiente al receptor Fc y C1q del complemento, lo que lleva a una activación disminuida de la microglía. Además, se ha demostrado que la reducción de agregados del péptido A $\beta$  después de la inmunización con A $\beta$ <sub>42</sub> de ratones Tg2576 knock-out de la cadena FcR- $\gamma$  (receptor para el fragmento Fc de la IgG), es equivalente a la reducción de depósitos del péptido A $\beta$  en la inmunización a la misma edad de ratones Tg2576 que si sintetizan la FcR, lo que sugiere que la porción de Fc del anticuerpo anti-A $\beta$ , que se requiere para la interacción con FcR, puede no ser necesaria para que sea efectiva la inmunoterapia con el péptido A $\beta$  (Das et al, 2003). El empleo de fragmentos de anticuerpos que carecen de la porción funcional Fc de una molécula de Ig completa, representa un acercamiento alternativo para la inmunoterapia pasiva para el tratamiento de la EA (Bacskai et al, 2002).

La inmunización pasiva podría ser de gran utilidad en personas de edad avanzada, cuyo sistema inmune, al igual que otros sistemas, se ve deteriorado por la edad. (Schenk, 2002). Bard y colaboradores (2000) administraron anticuerpos monoclonales y policlonales a modelos murinos de la EA, mediante inyecciones intraperitoneales con un intervalo semanal. Algunos anticuerpos lograban cruzar la barrera

hematoencefálica y unirse a depósitos amiloides, activando la fagocitosis de los mismos por células microgliales. En un estudio posterior, dirigido a encontrar las características de los anticuerpos efectivos en la limpieza de placas, dichos autores encontraron que sólo los anticuerpos dirigidos a las regiones aminoterminales del péptido amiloide activan la fagocitosis de las placas (Bard et al, 2003).

Sin embargo, se ha demostrado que la inmunización pasiva con anticuerpos anti-A $\beta$  puede provocar microhemorragias o meningoencefalitis autoinmune aséptica en ratones (Pfeifer et al, 2002; Lee et al, 2005 y Racke et al, 2005). De esta manera, en la EA el uso de fragmentos de anticuerpos para inmunoterapia presenta otra ventaja adicional, como lo es la carencia del dominio Fc del anticuerpo. La función del dominio Fc es la activación de microglía y células fagocíticas, que pueden producir reacciones adversas al administrarse o dirigirse al SNC. Para el estudio de la EA, algunos scFv han sido evaluados, y se ha encontrado que presentan las mismas propiedades anti-agregantes y/o desagregantes que los anticuerpos completos (Schenk et al, 1999; Das et al, 2003).

Uno de los resultados relevantes de este trabajo es que los fragmentos de anticuerpos seleccionados no reconocen la región amino-terminal del A $\beta$ <sub>42</sub>. Se ha sugerido que los anticuerpos que no son dirigidos a la región amino-terminal, no interactúan directamente con las placas amiloides. Se sugiere que la interacción de estos anticuerpos podría ser a través de la captura del péptido A $\beta$  amiloide soluble (DeMattos et al, 2001; Bard et al, 2000). Esta característica es importante ya que impiden la formación de placas amiloides, eliminando al péptido A $\beta$  soluble en forma de oligómeros.

Debido a que el análisis del cerebro en autopsias de pacientes con EA muestra que no existe una correlación directa entre el número de placas amiloides y el daño cognitivo, pero si existe correlación entre la pérdida sináptica y los niveles del péptido A $\beta$  soluble, se ha sugerido que la patogénesis de la EA involucra especies solubles del péptido A $\beta$  (Klein, 2002). Estos oligómeros de bajo peso molecular (dimeros, trímeros y tetrameros) (McLean et al, 1999; Cleary et al, 2005; Shankar et al, 2008), se encuentran en compartimentos intra y extracelulares, y afectan la plasticidad sináptica y la función cognitiva (Walsh et al, 2002; Cleary et al, 2005; Klyubin et al, 2005; Townsend et al, 2006; Shankar et al, 2008). Las preparaciones del péptido A $\beta$ <sub>42</sub> usadas en mi estudio, contienen oligómeros de bajo peso molecular. Además, los fragmentos de anticuerpo seleccionados en este estudio neutralizaron los efectos tóxicos de estas especies.

Otra cuestión importante que hay que considerar para la inmunoterapia, es que en pacientes con EA, síndrome de Down y modelos murinos de la EA se encuentran formas truncadas o aminomodificadas del péptido A $\beta$  en las placas difusas y compactas. Sin embargo, la mayoría de los anticuerpos empleados en estudios previos reconocen al epítipo inmunodominante del extremo amino-terminal (EFRH) del péptido A $\beta$ , que está ausente en péptidos N-truncados. Los anticuerpos recombinantes seleccionados en este estudio, se unen a péptidos N-truncados del A $\beta$ , por lo tanto, pueden dirigirse a un amplio rango de especies tóxicas del péptido A $\beta$ . Las modificaciones amino terminales que se presentan mayormente en diferentes especies del péptido A $\beta$  son la formación de piroglutamato en el residuo 3 del péptido A $\beta$  (A $\beta$ <sub>3-40/42</sub>) y, la isomerización o racemización del residuo Aspartato (1) del péptido completo (A $\beta$ <sub>40/42</sub>) (Tekiran et al, 1998; Saido et al, 1995).

Vanderstichele y colaboradores (2005) encontraron que el péptido amino truncado A $\beta$ <sub>8-42</sub>, se encuentra presente en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con la EA. En mi estudio se encontraron cinco anticuerpos recombinantes que presentan una alta inmunoreactividad hacia el péptido amino truncado A $\beta$ <sub>8-42</sub>. En estudios previos llevados a cabo por Naslund y colaboradores (1994) se reportó que entre las especies amino truncadas del péptido A $\beta$  encontradas en cerebros de pacientes con esta enfermedad están A $\beta$ <sub>4-42</sub> y A $\beta$ <sub>8-42</sub>. Además existen otras especies amino truncadas del péptido A $\beta$  (A $\beta$ <sub>3-42</sub>, A $\beta$ <sub>4-42</sub>, A $\beta$ <sub>8-42</sub>, A $\beta$ <sub>11-42</sub>, A $\beta$ <sub>17-42</sub>, etc) que están relacionados con las placas difusas y/o con las neuritas distróficas, siendo estos péptidos los principales antígenos tóxicos característicos de los primeros estudios de la EA (Sergeant, 2003; Lerner, 1999; Saido et al, 1995). Con base en lo anterior, se podrían considerar estas especies amino truncadas como blancos terapéuticos útiles para la prevención de los síntomas tempranos de la enfermedad, como lo son el daño sináptico y la formación inicial de las placas seniles, destacando que los anticuerpos recombinantes de este trabajo reconocen el péptido A $\beta$  N-truncado.

El campo de la generación de fragmentos de anticuerpo ha progresado rápidamente en los últimos años, debido al interés en su uso terapéutico. El descubrimiento de que los camélidos tienen anticuerpos funcionales que carecen de la cadena ligera, permite que se haga investigación de fragmentos de anticuerpos con un dominio sencillo (VHHs o nanobodies), aislar el dominio VH de los anticuerpos por su unión a un gran número de antígenos de interés (De Genst et al., 2006). Los dominios VH han sido empleados para el estudio de la etiología de varias enfermedades como el cáncer y un gran número de infecciones, inflamación y otras enfermedades (Harmsen et al, 2007). Estos estudios sustentan las propiedades de reconocimiento al antígeno que tienen estos dominios (Cai et al, 1995, 1996, 1997; Fang et al, 1995; Reiter et al, 1999; Bond

et al, 2003; Saerens et al, 2005). Cai y colaboradores (1997) compararon las propiedades de bibliotecas de VH y de scFv como una fuente de clonas específicas de melanomas y no observaron variación en las propiedades de reconocimiento de antígeno. Las ventajas de los anticuerpos con el dominio VH son su alta estabilidad y solubilidad, la penetración rápida al tejido y el reconocimiento de sitios antigénicos escondidos, así como su producción a bajo costo en microorganismos (Brekke al., 2003). Tres anticuepos de dominio VH seleccionados en este estudio pueden tener potencial interés para la terapia de la EA que se basa en anticuerpos.

La capacidad neuroprotectora de las cinco clonas seleccionadas en mi estudio contra los ADDLs en las células SH-SY5Y tiene relevancia para la inmunoterapia de la EA, ya que actualmente se sabe que el daño cognitivo y la disfunción sináptica es provocada principalmente por los ADDLs (Cleary, 2005; Kokubo et al, 2005). Se ha demostrado que los oligómeros de bajo peso molecular provocan daño en la memoria de forma temprana en modelos murinos de la EA. De esta manera, anticuerpos dirigidos a estas especies pueden ayudar a recuperar las funciones sinápticas y revertir las primeras manifestaciones de la EA (Klyubin et al, 2005; Lesne et al, 2006; Oddo et al, 2006). Los anticuerpos que reconocen ADDLs han sido también empleados para localizar ultraestructuralmente a estas especies (Lambert et al, 2001). Estas clonas también podrían tener aplicación en el diagnóstico de la EA, debido a que se ha encontrado que los oligómeros presentes en el líquido cefalorraquídeo pueden ser evaluados como biomarcadores para el diagnóstico de la EA (Klein, 2006).

Otra aplicación interesante de los VH y scFv seleccionados, puede ser su expresión como anticuerpos intracelulares (*intrabodies*), que permite dirigirlos al pool intracelular del péptido A $\beta$  (Gouras et al, 2005; LaFerla et al, 2007). Un número de anticuerpos recombinantes intracelular, que se unen a microtúbulos asociados a la proteína tau, agregados intracelulares de la huntingtina y proteínas pro-apoptóticas como Bax, fueron aislados y caracterizados a partir de bibliotecas de anticuerpos sintéticas y *naïve* (Lecerf et al, 2001; Visintin et al, 2002; Gueorguieva et al, 2006). Fukuchi y colaboradores (2006) demostraron que estos anticuerpos recombinantes fueron expresados de manera estable en células de mamífero como *intrabodies* y se observó que no son tóxicos para la célula. Además, se logró una mejora en el aprendizaje y memoria de los ratones Tg2576, con la expresión intracelular de un scFv anti-A $\beta$ , via adenovirus, (Fukuchi et al, 2006). Más recientemente, fueron seleccionados scFv anti-A $\beta$ , dirigidos a oligómeros del péptido A $\beta$  intracelulares que reconocen tanto la región N-terminal como la C-terminal del péptido A $\beta$  (Meli et al, 2009). Además, algunos de estos scFv reconocen los depósitos del péptido A $\beta$  en secciones de cerebros de pacientes con EA y presentan propiedades de neutralización de la toxicidad mediada

por los oligómeros del péptido A $\beta$ , así como la unión de éstos en las sinapsis en cultivos neuronales. Por lo tanto, la selección de anticuerpos recombinantes anti-A $\beta$  intracelulares puede representar un nuevo acercamiento de interés para desarrollar estrategias terapéuticas para la EA.

Finalmente, todos los scFv y VH solubles seleccionados en este estudio, muestran una inmunoreactividad específica en secciones de cerebros de ratones transgénicos, además de la reactividad específica del péptido A $\beta$  sintético. En contraste con la mayoría de anticuerpos anti-A $\beta$  en uso, los seleccionados en este estudio, muestran patrones de inmunoreactividad no dirigidos al centro de las placas, lo que los convierte en moléculas prometedoras dirigidas a oligómeros del péptido A $\beta$  en el cerebro humano. Recientemente, O'Callaghan y colaboradores observaron un patrón de tinción de cerebros de ratones Tg2576 similar, empleando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-A $\beta_{42}$  (6E10) (O'Callaghan et al, 2008). La unión de fragmentos de anticuerpos seleccionados a agregados naturales del péptido A $\beta$  es importante, pues se pueden considerar moléculas que podrían ayudar a identificar depósitos amiloides en el cerebro de humanos.

## CONCLUSIONES

En este trabajo se construyó una biblioteca de scFv y VH, murina, inmune (anti-A $\beta$ ) y expresada en la proteína p3 y p8 del fago M13 respectivamente, con el objeto de identificar y caracterizar scFv's y VH's que se unan al péptido A $\beta$ . Además se seleccionaron scFv's de una biblioteca de humano no inmune expresada en la proteína p3 del fago M13 para identificar anticuerpos recombinantes anti-A $\beta$ . Posteriormente estos fragmentos podrán ser evaluados como moléculas inmunoterapéuticas para la prevención y/o tratamiento de la EA. Con la biblioteca de VH murina inmune (anti-A $\beta$ ) se encontraron tres clonas anti-A $\beta$ : C 1.28, C 1.27 y C 2.8. A partir de la biblioteca de scFv humana no inmune se encontraron dos clonas anti-A $\beta$ : scFv 3.20 y scFv 4.8.

Mediante el mapeo de las cinco clonas (de VH y scFv), usando fragmentos del péptido A $\beta_{42}$  y se encontró que no están dirigidas al extremo inmunodominante amino-terminal del péptido A $\beta$ . Con la secuencia de DNA de cada clona se encontró que son diferentes entre sí y tienen el inserto de VH o scFv completo en su genoma.

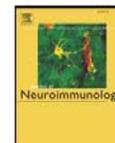
Además, en ensayos *in vitro*, se observó que estas cinco clonas protegen a las células de neuroblastoma humano, SH-SY5Y, de los efectos tóxicos de los ADDLs.

También se encontró que los scFv solubles presentan reactividad específica al péptido A $\beta$  natural, que se encuentra en secciones de cerebros del modelo murino de la EA (Tg2576). Esta inmunoreactividad está dirigida hacia la periferia de las placas neuríticas, lo que sugiere una mayor reacción hacia los oligómeros del péptido A $\beta$  y no a las fibrillas densas del centro de las placas neuríticas.

Las cinco clonas seleccionadas son de gran importancia debido a que no reconocen el extremo inmunodominante amino-terminal del péptido A $\beta$ . La región 17-42 del péptido es considerada la más citotóxica y es una de las formas más predominantes de los depósitos difusos. Por lo tanto, se puede considerar el gran potencial de anticuerpos recombinantes o de sus fragmentos para la inmunoterapia para la EA. Los VH y scFv seleccionados en este estudio, podrían ser de interés como componentes de terapias futuras basadas en anticuerpos para la EA, así como para otras enfermedades neurodegenerativas.

## PERSPECTIVAS

La inmunoterapia basada en la utilización de anticuerpos anti-A $\beta$  para la prevención y/o tratamiento de la EA, es de gran interés e importancia y requiere de investigaciones amplias y profundas, con el fin de desarrollar y estudiar nuevas moléculas protectoras sin efectos secundarios. Debido a ello, se puede considerar el gran potencial de los anticuerpos recombinantes o de sus fragmentos para la inmunoterapia para la EA. Los VH y scFv seleccionados en este estudio, podrían ser utilizados en terapias futuras basadas en anticuerpos para la EA.



1 Novel amyloid-beta specific scFv and VH antibody fragments from human and mouse  
2 phage display antibody libraries

3 M. Medecigo <sup>a</sup>, K. Manoutcharian <sup>a</sup>, V. Vasilevko <sup>d</sup>, T. Govezensky <sup>a</sup>, M.E. Munguia <sup>a</sup>, B. Becerril <sup>c</sup>,  
4 A. Luz-Madrigal <sup>a,b</sup>, L. Vaca <sup>b</sup>, D.H. Cribbs <sup>d,e</sup>, G. Gevorkian <sup>a,\*</sup>

5 <sup>a</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), AP 70228, Ciudad Universitaria, México DF, 04510, Mexico

6 <sup>b</sup> Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), AP 70228, Ciudad Universitaria, México DF, 04510, Mexico

7 <sup>c</sup> Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, 62210, Mexico

8 <sup>d</sup> The Institute for Memory Impairments and Neurological Disorders, University of California Irvine, Irvine, CA 92697-4540, USA

9 <sup>e</sup> Department of Neurology, University of California Irvine, Irvine, CA 92697-4540, USA

10

## ARTICLE INFO

11  
12 Article history:  
13 Received 14 October 2009  
14 Received in revised form 26 March 2010  
15 Accepted 31 March 2010  
16 Available online xxxx

17  
18 Keywords:  
19 Alzheimer's disease  
20 Recombinant antibody fragment  
21 Domain antibody

## ABSTRACT

Anti-amyloid immunotherapy has been proposed as an appropriate therapeutic approach for Alzheimer's 24  
disease (AD). Significant efforts have been made towards the generation and assessment of antibody-based 25  
reagents capable of preventing and clearing amyloid aggregates as well as preventing their synaptotoxic 26  
effects. In this study, we selected a novel set of human anti-amyloid-beta peptide 1-42 (A $\beta$ 1-42) 27  
recombinant monoclonal antibodies in a single chain fragment variable (scFv) and a single domain (VH) 28  
format. We demonstrated that these antibody fragments recognize in a specific manner amyloid-beta 29  
deposits in APP/Tg mouse brains, inhibit toxicity of oligomeric A $\beta$ 1-42 in neuroblastoma cell cultures in a 30  
concentration-dependent manner and reduced amyloid deposits in APP/Tg2576 mice after intracranial 31  
administration. These antibody fragments recognize epitopes in the middle/C-terminus region of A $\beta$ , which 32  
makes them strong therapeutic candidates due to the fact that most of the A $\beta$  species found in the brains of 33  
AD patients display extensive N-terminus truncations/modifications. 34

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved. 35

36

## 1. Introduction

37  
38  
39  
40  
41 The accumulation of extracellular and intracellular amyloid-beta  
42 (A $\beta$ ) peptide aggregates in the human brain has been hypothesized to  
43 play a central role in the neuropathology of Alzheimer's disease (AD)  
44 (Haass and Selkoe, 2007; La Ferla et al., 2007; Walsh and Selkoe, 2007).  
45 Anti-A $\beta$  immunotherapy has been shown to disrupt A $\beta$  aggregates,  
46 block aggregation, attenuate toxicity, as well as promote the clearance of  
47 the peptide in the central nervous system (CNS) in animal models.  
48 Immunotherapy approaches, both active immunization with A $\beta$  peptide  
49 and passive transfer of anti-A $\beta$  antibodies, have shown therapeutic  
50 efficacy in several amyloid precursor protein transgenic (APP/Tg)  
51 mouse models, which develop AD-like amyloid plaque pathology  
52 (Schenk et al., 1999; Bard et al., 2000; Janus et al., 2000; Hartman  
53 et al., 2005; Morgan, 2006; Brody and Holtzman, 2008), as well as in  
54 canine and primate models of amyloidosis (Lemere et al., 2004; Head  
55 et al., 2008). However, active immunization in human clinical trials  
56 resulted in the development of brain inflammation in some patients  
57 (Munch and Robinson, 2002; Gilman et al., 2005; Holmes et al., 2008).

The hypothesis that passive antibody immunotherapy could be more 58  
appropriate as a therapeutic approach for AD promoted efforts towards 59  
the generation and application of antibody-based reagents capable of 60  
preventing and clearing amyloid deposits as well as preventing their 61  
synaptotoxic effects and increasing structural plasticity of dendritic 62  
spines (Bard et al., 2000; Kotilinek et al., 2002; Lombardo et al., 2003; 63  
Fukuchi et al., 2006; Levites et al., 2006; Wilcock and Colton, 2008; 64  
Wisniewski and Konietzko, 2008; Spire-Jones et al., 2009). A phase IIa 65  
study of passive immunization in patients with mild to moderate AD 66  
using an antibody binding to a central region of A $\beta$ 1-42 peptide and 67  
named LY2062430 started in May 2006 and Eli Lilly announced that they 68  
initiated a U.S. phase 3 clinical trial in 2009. Another monoclonal 69  
antibody AAB-001 directed against an amino-terminal part of A $\beta$ 1-42 70  
peptide is being used for passive immunotherapy by Elan/Wyeth in a 71  
phase 3 clinical trial. However, there are reports that passive 72  
immunization also may show adverse side effects, such as, vasogenic 73  
edema, microhemorrhages and increased vascular amyloid angiopathy 74  
observed after administration of mouse monoclonal anti-A $\beta$  antibodies 75  
in transgenic mice (Pfeifer et al., 2002; Wilcock et al., 2004; Lee et al., 76  
2005). Efforts have been made to generate antibodies recognizing other 77  
linear or conformational epitopes within A $\beta$ 1-42 that may be 78  
biologically functional without being associated with the development 79  
of adverse events. This could be achieved, for example, by using phage 80  
displayed recombinant antibody (Ab) fragment libraries that results in 81

\* Corresponding author. Tel.: +1 525556223151; fax: +1 525556223369.  
E-mail address: [gokar@servidor.unam.mx](mailto:gokar@servidor.unam.mx) (G. Gevorkian).

82 the generation of a panel of specific antibodies quickly, easily and cost-  
83 effectively in vitro. The antibody fragments, such as single chain Fv  
84 (scFv), Fab and domain or single-domain Abs (dAbs or sdAbs) are now  
85 considered, along with conventional intact Abs, as powerful therapeutic  
86 and diagnostic agents, particularly for targeting cancer, inflammatory,  
87 autoimmune and infectious diseases (Holliger and Hudson, 2005).  
88 Several Ab fragments are currently in clinical trials including late stages  
89 of clinical development (Holt et al., 2003; Demarest and Glaser, 2008;  
90 Weisser and Hall, 2009; Wilcock et al., 2009). However, despite the  
91 general acceptance of the utility of Abs targeting A $\beta$  as promising  
92 therapeutics for AD and a number of reports on A $\beta$ -specific recombinant  
93 antibody fragments (scFvs and Fabs), these molecules are not progres-  
94 sively currently to late-phase clinical trials (Frenkel et al., 2000; Tammer  
95 et al., 2002; Manoutcharian et al., 2003; Manoutcharian et al., 2004;  
96 Levites, 2006; Lichtlen and Mohajeri, 2008; Zameer et al., 2008).

97 The dAbs, bearing Ig heavy (VH) or light chain (VL) variable domains,  
98 are Ab-derived recognition units of 11–15 kDa and have been shown to  
99 possess unique and superior properties for a range of diagnostic and  
100 therapeutic applications (Holliger and Hudson, 2005). Interest to these  
101 types of molecules was recently revived after the discovery that  
102 camelids and cartilaginous fish naturally produce heavy chain Abs  
103 (with VH domains called VHH and V-NAR, respectively) that are devoid  
104 of light chains. Several VH, VHH and VL dAbs against various antigen  
105 targets were isolated from camel, shark, mouse and human phage  
106 display antibody libraries and evaluated in vivo (Holt et al., 2003;  
107 Holliger and Hudson, 2005; De Bernardis et al., 2007; Harmsen and De  
108 Haard, 2007). Recently, a conformational antibody domain that  
109 prevented mature amyloid fibril formation by stabilizing A $\beta$  protofibrils  
110 was selected from a fully synthetic library of camelid VHH domains  
111 (Habicht et al., 2007). Also, two VHH antibodies, binding to low-  
112 molecular weight A $\beta$  oligomers were obtained from an immunized  
113 alpaca phage display library (Lafaye et al., 2008).

114 In the present study, we developed a novel strategy for the  
115 generation of dAbs consisting in expression of Ig VH repertoire, fused  
116 to M13 bacteriophage cpVIII, at high copy numbers on the phage surface.  
117 We used this approach to construct a phage display VH domain library  
118 from mice immunized with A $\beta$ 1–42. This immune mouse library as well  
119 as a non-immune human scFv antibody library was used for the  
120 selection of recombinant antibody fragments recognizing A $\beta$ 1–42  
121 peptide. Five A $\beta$ -specific antibody fragments were selected and  
122 shown to neutralize the toxicity of oligomeric A $\beta$ 42 tested in vitro in  
123 differentiated SH-SY5Y and IMR-32 cell cultures. In addition, these  
124 antibodies bound specifically to amyloid-beta deposits present in  
125 transgenic mouse brain. Finally, we showed that one of the tested VH  
126 antibody fragments reduced amyloid load after intracranial delivery  
127 into the Tg2576 mouse. These antibody fragments may be considered as  
128 potential therapeutic candidates for passive AD immunotherapy.

## 129 2. Materials and methods

### 130 2.1. Materials

131 Chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).  
132 Synthetic human A $\beta$ 1–42, A $\beta$ 1–16, A $\beta$ 8–42, A $\beta$ 12–28, A $\beta$ 17–42 and  
133 A $\beta$ 35–25, as well as N-pyroglytamate modified peptides A $\beta$ N3(pE)  
134 and A $\beta$ N11(pE), were purchased from Ana Spec (San Jose, CA, USA). A  
135 non-related peptide used as a negative control (NRP; amino acid  
136 sequence: AALSPGSSAYPSATVLA) was synthesized in our laboratory.  
137 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP), Thioflavin T, all-trans reti-  
138 noic acid and dibutyl cAMP were from Sigma. HRP-conjugated anti-  
139 mouse IgG, IgG1 and IgG2b and HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG  
140 were from Zymed (San Francisco, CA, USA). Super Signal West Dura  
141 Extended Duration Substrate kit was from Pierce, Rockford, IL, USA.  
142 Cell culture media (DMEM/F12, 1:1) were from GIBCO (Grand Island,  
143 NY, USA).

### 2.2. Construction of phage displayed VH library from mouse immunized with A $\beta$ 1–42

144 Construction of VH library was carried out essentially as described  
145 in our previous study (Manoutcharian et al., 2003). All molecular  
146 biology procedures were carried out using standard protocols or as  
147 recommended by manufacturers. Restriction enzymes, DNA isolation/  
148 purification kits, mRNA extraction and cDNA synthesis kits, DNA  
149 polymerase, T4 DNA ligase and helper phage were obtained from  
150 Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA), Invitrogen (Carlsbad,  
151 CA, USA) or New England Biolabs (MA, USA). The oligonucleotides  
152 were synthesized at Invitrogen. The phagemid vector pG8SAET  
153 allowing the expression of foreign polypeptides as fusions with the  
154 major coat protein (cpVIII) on M13 phage and described previously in  
155 our studies was used (Manoutcharian et al., 2005). To allow the  
156 cloning of cDNA coding for VH domains, new restriction sites Xho I,  
157 Hind III and Not I were introduced by cloning a DNA fragment into the  
158 pG8SAET vector at Nco I and Bam HI sites. This DNA was generated by  
159 combining a pair of complementary oligonucleotides 5MP: CATGC  
160 CATGGTCTCGAGAAGCTTGGGGCCGCTGGTCCGCGGTGCCGTATCCG  
161 GACCCACTGGAACCGCGTGCTTAGG and 3ANMP: GGTACCA  
162 GAGCTCTTGAACCGCCGCGACACCGCGCCACCGCATAGGCTCGGT  
163 GACCTGGCGCACGGATCCCTAG in an annealing reaction creating Nco  
164 I and Bam HI restriction sites at 5' and 3' ends of the DNA fragment,  
165 respectively. About 1  $\mu$ g of this DNA was ligated using T4 DNA ligase to  
166 approximately 0.5  $\mu$ g of Nco I/Bam HI digested and gel-purified  
167 pG8SAET vector DNA. The ligation mixture was used to transform  
168 chemically competent *Escherichia coli* TG1 bacteria and transformed  
169 cells were plated on LB-Amp plates. The correct cloning was  
170 confirmed by DNA sequencing of several clones. The plasmid DNA  
171 of modified pG8SAET vector was isolated and used for the cloning of  
172 VH library. The cDNA fragments coding for Ig VH domains were  
173 generated as described previously (Manoutcharian et al., 2003).  
174 Briefly, the mRNA was extracted from the splenocytes of mice  
175 immunized with A $\beta$  peptide using QuickPrep mRNA Purification Kit  
176 (Amersham) and first strand cDNA was synthesized from mRNA using  
177 random pd(N)<sub>6</sub> primers according to RPAS Mouse scFv Module  
178 (Amersham). The VH domain genes were amplified by PCR using  
179 specific primers from the same kit and the obtained DNA, after gel  
180 purification, using Concert Rapid Gel Extraction System (Marligen  
181 Biosciences, MD, USA), was used as template in a second PCR. Two  
182 primers carrying restriction sites Nco I and Hind III (underlined) were  
183 used for PCR reamplification of VH genes, 5PCANT: ATATTGCATGTC-  
184 GAGACGCGTATCCATGGTAGTTGTTCTTCTATGGGCGCCAGCCGGCC  
185 and 3LINK: TTCTTAGATCGTCGAC AAGCTTCGATCCGCCACCCCA-  
186 GAGCCACTCCGCCT. The PCR products were gel purified, digested  
187 with Nco I and Hind III, column purified and ligated with similarly  
188 digested DNA of modified pG8SAET vector as described above. The  
189 ligated DNA was column purified and introduced into *E. coli* TG1 cells  
190 by electroporation using Gene Pulser II System (Bio-Rad Laborato-  
191 ries). Ten electroporations were performed, and the transformed TG1  
192 cells were plated on LB-Amp plates to determine the diversity of the  
193 library. Ten individual bacterial colonies were used to analyze the  
194 quality of the library by PCR. The resultant phagemid library was  
195 rescued/amplified using M13KO7 helper phage (Invitrogen), purified  
196 by double PEG/NaCl (20% w/v polyethylene glycol-8000; 2.5 M NaCl)  
197 precipitation and resuspended in Tris-buffered saline (TBS). The  
198 typical phage yields were 10<sup>11</sup>–10<sup>12</sup> colony-forming units (cfu) per  
199 milliliter of culture medium.

### 2.3. Peptide preparation and WB

200 A $\beta$ 1–42 was dissolved in HFIP to allow a conversion to the monomer  
201 and, after evaporation of solvent, was stored in aliquots at –20 °C.  
202 Oligomeric A $\beta$ 1–42, A $\beta$ N3(pE) and A $\beta$ N11(pE) were prepared from  
203 monomers essentially as described previously (Klein, 2002).  
204

Please cite this article as: Medecigo, M., et al., Novel amyloid-beta specific scFv and VH antibody fragments from human and mouse phage display antibody libraries, J. Neuroimmunol. (2010), doi:10.1016/j.jneuroim.2010.03.023

207 Oligomerization was performed at 4 °C or at 37 °C for 72 h. A $\beta$ 1-16,  
208 A $\beta$ 8-42, A $\beta$ 12-28, A $\beta$ 17-42, A $\beta$ 35-25 and a non-related peptide (NRP,  
209 amino acid sequence: AALSPGSSAYPSATVLA) were dissolved in water at  
210 a concentration of 1 mg per ml. All oligomeric A $\beta$ 1-42 preparations  
211 were separated by electrophoresis on 4–12% polyacrilamide precast  
212 NuPAGE Bis-Tris gels (Invitrogen) at 100 V for 1 h 45 min. After  
213 electrophoresis, the peptides were transferred onto a PVDF membrane  
214 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using a semi dry blot system (Bio-Rad) at  
215 25 V for 50 min. Then the membranes were blocked in PBS/2% non-fat  
216 dry milk/0.2% Triton X-100 overnight at 4 °C. Incubation with primary  
217 antibodies – 4G8 (1:2000), a monoclonal anti- $\beta$ -amyloid antibody  
218 (Sigma) – was carried out overnight at 4 °C. After washing with PBS/0.2%  
219 Tween, the membranes were incubated with HRP-conjugated anti-  
220 mouse IgG2b, 1:2500, for 2 h at RT. Immunoreactive bands were  
221 detected by chemiluminescence using SuperSignal West Dura Extended  
222 Duration Substrate kit (Pierce).

#### 223 2.4. Selection of A $\beta$ -specific VH and scFv antibodies by biopanning 224 against A $\beta$ 1-42 peptide

225 Selection and amplification procedures for the immune mouse VH  
226 library and a non-immune human scFv library were carried out  
227 essentially as described (Manoutcharian et al., 2003; Manoutcharian  
228 et al., 2004). Three rounds of biopanning were performed. In each  
229 round, we rescued phagemid library using helper phage M13K07.  
230 After each round, 20 to 40 clones were isolated and their DNA inserts  
231 were analyzed by PCR. Phage clones carrying full-length DNA inserts were  
232 further evaluated in ELISA as described previously (Manoutcharian et al.,  
233 2003; Manoutcharian et al., 2004). Expression in pSyn1 vector and  
234 purification of soluble antibody fragments were performed essentially as  
235 described in our previous reports (Riaño-Umbarila et al., 2005). All soluble  
236 amino-terminal His<sub>6</sub>-tagged VHs were produced using the baculovirus  
237 expression system. Briefly, the corresponding VH region (VH1.27, 2.8 or  
238 1.28) was amplified by PCR using the primers VH1.27 (5'-atcagatc-  
239 gaaatcagcagctca-3' and 5'-agatcgactgagcagcggtagcctggt-3'), VH2.8 (5'-  
240 atcagatcctcaggtcaaacctcaggaggag-3' and 5'-atcgtcagctgagacggtagcctg-  
241 3'), and VH1.28 (5'-atcagatcctcaggtcaggagctcgg-3' and 5'-atcgtcagctgga  
242 gacggtagcagc-3') containing the restrictions sites BglII and Sall (under-  
243 lined). After amplification, gel purified and digested fragments were  
244 ligated into pBlueHis2B (Invitrogen, Carlsbad, CA) using the same  
245 restriction sites. The resulting plasmids were designed pBlueHis-  
246 VH1.27, pBlueHis-VH2.8 and pBlueHis-VH1.28. The recombinant  
247 baculoviruses were subsequently generated using the Bac-N-Blue  
248 system (Invitrogen, Carlsbad, CA) as previously reported and  
249 designed BacHis-VH1.27, BacHis-VH2.8 and BacHis-VH1.28, respec-  
250 tively. The recombinant virus selection and amplification were  
251 performed as previously described (Luz-Madriral et al., 2007). For  
252 large-scale production of His<sub>6</sub>-tagged VHs, separately  $1 \times 10^6$   
253 ( $2 \times 10^6$ /ml) Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) cells were infected at a  
254 multiplicity of infection (MOI) of 5 and were collected after 72 h by  
255 centrifugation at 1000  $\times$ g during 10 min at 4 °C. Cells were treated  
256 with insect lysis buffer [10 mM Tris Cl, pH7.5, 130 mM NaCl, 1% (v/v)  
257 Triton X-100, 10 mM NaF, 10 mM sodium phosphate, pH7.5, 10 mM  
258 sodium pyrophosphate] containing complete protease inhibitor  
259 cocktail (Roche, biochemical) and incubated during 45 min on ice.  
260 The lysate was clarified by centrifugation at 40,000  $\times$ g during 30 min  
261 at 4 °C. The scFvs and His<sub>6</sub>-tagged VHs were purified by Ni<sup>2+</sup>-NTA  
262 affinity chromatography (Qiagen, Hilden, Germany), and eluted with  
263 1 ml of 250 mM imidazole.

#### 264 2.5. ELISA binding of positive VH- or scFv-bearing phage clones to full-length 265 A $\beta$ 1-42 and fragments

266 ELISA analysis was carried out using MaxiSorp microtiter plates  
267 (Nunc, Roskilde, Denmark) coated overnight with a synthetic peptide at  
268 a concentration of 2  $\mu$ g/ml in carbonate buffer (pH 9.6). After washing

with phosphate buffer containing 0.2% Tween-20 (PBS-Tween), plates  
were blocked with PBS/non-fat milk (2%) for 1 h at room temperature  
(RT). Plates were washed, then phage previously incubated for 30 min  
at RT with PBS/non-fat milk (2%)/triton X-100 (0.2%), was added at a  
concentration of  $10^{11}$  per ml, and after incubation for 2 h at RT, plates  
were washed with PBS-Tween. HRP/anti-M13 monoclonal conjugate  
(Amersham) diluted in PBS/milk/triton was added, and plates were  
incubated for 1 h at RT. Monoclonal anti- $\beta$ -amyloid antibodies BAM90.1  
and 4G8, used as a positive control to test the peptide binding to well  
surface, were from Sigma. Polyclonal mouse anti-human A $\beta$ 1-42 and  
A $\beta$ 8-42 antibodies as well as rabbit anti-A $\beta$ N3(pE) and A $\beta$ N11(pE)  
antibodies, also used as positive controls, were produced previously in  
our laboratory (Manoutcharian et al., 2003; Acero et al., 2009). HRP-goat  
anti-mouse IgG (H+L) conjugate (for mouse sera analysis), HRP-  
conjugated rabbit anti-mouse IgG1 (for BAM90.1) and HRP-conjugated  
rabbit anti-mouse IgG2b (for 4G8) diluted in PBS/milk/triton were used  
as recommended by the manufacturer. Plates were washed and 2,2'-  
azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) single  
solution (Zymed) was added. The OD reading at 405 nm was  
registered using Opsy MR Microplate Reader (DYNEX Technologies,  
Chantilly, VA, USA).

#### 269 2.6. DNA sequencing

270 The DNA sequences of the inserts of phage clones were determined  
271 on automated ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems,  
272 CA, USA) using miniprep-purified double-stranded DNA and pG8SAET  
273 vector-based 5' and 3' primers. The DNA and deduced amino acid  
274 sequences were analyzed by computer search with ExPASy Molecular  
275 Biology server, BLAST and IMGT (International ImMunoGeneTics  
276 System) databases.

#### 277 2.7. Inhibition of A $\beta$ 1-42 toxicity in vitro by selected VH and scFvs in SH- 278 SY5Y and IMR-32 cell cultures

279 Human neuroblastoma SH-SY5Y and IMR-32 cells obtained from  
300 the American Type Culture Collection (ATCC, VA, USA) were  
301 maintained in DMEM/F12 (1:1) supplemented with 10% heat-  
302 inactivated fetal bovine serum (GIBCO) and penicillin-streptomycin  
303 (GIBCO) and differentiated for 8–10 days in the presence of 10  $\mu$ M all-  
304 trans retinoic acid (SH-SY5Y) or 1 mM dibutyryl cAMP (IMR-32 cells).  
305 To test the inhibitory effects of compounds on the neuronal toxicity  
306 induced by A $\beta$ 1-42, cells were plated at a density of  $1 \times 10^4$  cells/  
307 200  $\mu$ l per well in 96-well tissue culture plates (Corning, NY, USA). For  
308 all assays, A $\beta$ 1-42 peptide preparations were mixed to a final  
309 concentration of 20  $\mu$ mol/ml in OPTI-MEM serum free medium  
310 containing 200 U/ml penicillin and 200  $\mu$ g/ml streptomycin. Synthetic  
311 A $\beta$ 35-25 was used as a negative control. Phage bearing VH antibody  
312 (c.c1.27, c.c1.28 and c.c2.8) or scFv antibody (3.20, 4.4, 4.8) and  
313 control phage diluted in TBS were mixed with A $\beta$ 1-42 peptide to a  
314 final concentration from  $10^{10}$  to  $10^{12}$  cfu/ml and incubated overnight  
315 at 4 °C. Before treatment of cells, the old medium was removed and  
316 the peptide preparation (with or without phage) was added to each  
317 well and incubated for 24 h. Cell viability was assessed using an XTT  
318 cytotoxicity assay (sodium [3-(4-phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium-  
319 lium]-bis [4-methoxy-6-nitro] benzene sulfonic acid hydrate) (Roche,  
320 IN, USA) according to the manufacturer's instructions. Fifty microliters  
321 of XTT was added to each plate and incubated for 4 h at 37 °C and 5%  
322 CO<sub>2</sub>. The OD reading at 500 nm was registered using Opsy MR  
323 Microplate Reader (DYNEX Technologies).

#### 324 2.8. Immunohistochemical analysis

325 Antibody fragments were also used to assay if they recognized dense  
326 core plaques on brain sections from APP Tg2576 mice (Hsiao et al., 327  
1996). Briefly, 18-month-old APP/Tg mice and wild type mice were

Please cite this article as: Medecigo, M., et al., Novel amyloid-beta specific scFv and VH antibody fragments from human and mouse phage display antibody libraries, J. Neuroimmunol. (2010), doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.03.023

329 overdosed with 100 mg/kg Nembutal and intracardially perfused with  
 330 ice-cold PBS, pH 7.4, and their brains were collected and fixed overnight  
 331 in 4% paraformaldehyde. Coronal sections 40  $\mu$ m thick were mounted  
 332 on glass slides and air-dried. After antigen retrieval in 90% formic acid for  
 333 5 min, and autofluorescence quenching by incubating in TBS containing  
 334 10% methanol and 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min at room temperature, scFv  
 335 antibody fragments were diluted 1:100 and added to the slides. After  
 336 overnight incubation at 4 °C, slides were washed and mouse anti-myc  
 337 antibodies (Zymed) were added, followed by goat anti-mouse Alexa-  
 338 Fluor 488 (Invitrogen). Slides were then incubated with rabbit anti-  
 339 A $\beta$ 1-42 antibodies (established in the Lab) at 1:1000 followed by goat  
 340 anti-rabbit Alexa-Fluor 594 (Invitrogen) at 1:1000. After extensive  
 341 washing, slides were coverslipped with Fluoromount-G (Southern  
 342 Biotech, Birmingham, AL) (Petrushina et al., 2007). In the case of VH  
 343 fragments, rabbit polyclonal anti-histidine (His-probe H-15, Santa Cruz  
 344 Biotechnology, CA, USA) antibodies were used followed by goat anti-  
 345 rabbit Alexa-Fluor 594 (Invitrogen). Then slides were incubated with  
 346 Thioflavin T (0.5% in 50% ethanol), and after extensive washing, were  
 347 coverslipped as described above.

348 Confocal images (size 1024  $\times$  1024 pixel or 800  $\times$  800 pixel) were  
 349 collected sequentially at RT on an FV1000 confocal laser scanning  
 350 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) using a 60 $\times$  or 40 $\times$  objective  
 351 lens (UPLSAPO NA = 1.35 and UPLFLN NA = 1.30, respectively). FITC  
 352 or Thioflavin T fluorescence was obtained after exciting the samples  
 353 with a wavelength of 488 nm and reading the fluorescence at 519 nm.  
 354 For the detection of rhodamine the excitation wavelength was  
 355 543 nm and emission was collected at 578 nm. The fluorescence  
 356 intensity was set optimally for control slides (scFv untreated slides)  
 357 and this exposure was retained for slides treated with a negative scFv  
 358 and those treated with scFv (3.20, 4.4 and 4.8) and VH (1.27, 2.8 and  
 359 1.28). Image reconstruction was achieved by performing optical slices  
 360 of hippocampus of mouse brain taken 0.3–0.45  $\mu$ m apart in stacks  
 361 about 20–25 images. All images were obtained from a minimum of  
 362 8 slices and at least 5 different plaques. From these image stacks,  
 363 three-dimensional (3D) digital models of plaques were reconstructed  
 364 by image thresholding and surface rendering employing Imaris 5.0.3  
 365 software (Bitplane AG, Zurich, Switzerland) and CorelDRAW X3.  
 366 Images from controls and treated cells were processed under similar  
 367 conditions.

### 368 2.9. Intracranial injections

369 The 14-month-old Tg2576 mice (Hsiao et al., 1996) were used in  
 370 this study. Mice were anesthetized with Nembutal (50 mg/kg body  
 371 weight) and placed in a stereotactic apparatus (MyNeuroLab, St. Louis,  
 372 MO) with a mouse adaptor as described previously (Vašilevko et al.,  
 373 2007). Briefly, experimental and control phage were diluted in PBS  
 374 (10<sup>10</sup> pfu/ $\mu$ l), and anti-A $\beta$  monoclonal 6E10 antibody (Covance  
 375 Research Products, Berkeley, CA) at a concentration of 1 mg/ml was  
 376 used as a positive control. Experimental and control agents were  
 377 injected into the left hippocampus through a 33 gauge injector  
 378 attached to a 10  $\mu$ l Hamilton syringe (Hamilton, Reno, NV). The  
 379 coordinates, with respect to bregma, were 2.7 mm posterior, 2.5 mm  
 380 lateral, and 3.0 mm ventral to the skull. Two microliters of agents  
 381 were injected over the span of 5 min, after which the cannula was left  
 382 in place for an additional 2 min to allow for diffusion. Animals were  
 383 placed on a warming pad until they had fully recovered from  
 384 anesthesia and were kept in individual cages to prevent damage to  
 385 the sutures. Seven days later, mice were overdosed with 100 mg/kg  
 386 Nembutal and intracardially perfused with ice-cold PBS, pH 7.2, and  
 387 their brains were fixed in 4% paraformaldehyde overnight. For  
 388 immunostaining of A $\beta$  deposits, sections were cut in the coronal  
 389 plane at 40  $\mu$ m using a vibratome, and after the antigen retrieval in  
 390 70% formic acid, were stained with rabbit polyclonal anti-A $\beta$  primary  
 391 antibodies followed by goat anti-rabbit biotinylated secondary  
 392 antibodies and ABC-HRP system from Vector Laboratories (Burlin-

393 game, CA). Primary antibodies were visualized with diaminobenzi-  
 394 dine solution (Vector Laboratories). At least five sections both  
 395 anterior and posterior to the site of injection were stained for A $\beta$   
 396 load and analyzed using ImageJ software. 396

### 2.10. Statistical analysis

397 For multiple comparisons ANOVA and post-hoc Tukey test were  
 398 used. SPSS Release 9.0.0 statistical software program was employed. 399

## 3. Results

### 3.1. Construction of phage displayed VH library and selection of A $\beta$ - specific VH and scFv antibodies by biopanning against A $\beta$

400 For construction of phage displayed VH immune library, spleen  
 401 cells from mice immunized with A $\beta$ 1-42 peptide were used as a  
 402 source of Ig VH genes. The cDNAs coding for VH domains were  
 403 amplified by PCR and cloned into the phagemid vector allowing the  
 404 expression of VH fused to a major coat protein VIII (cpVIII) of M13  
 405 phage at high copy numbers. The estimated number of cpVIII fusions  
 406 expressed on hybrid phage particles is 300–900 copies per phage  
 407 (Willis et al., 1999). Antibody VH single-domain phage display library  
 408 consisting of 8  $\times$  10<sup>8</sup> independent clones was generated and, more  
 409 than 90% of clones were shown to carry the inserts of correct size  
 410 (data not shown). 410 Q14

411 To select recombinant antibody fragments recognizing A $\beta$ 1-42, the  
 412 constructed VH mouse immune library as well as a scFv human naïve  
 413 library, described in our previous studies (Manoutcharian et al.,  
 414 2004), was screened against oligomeric A $\beta$ 1-42. All oligomeric  
 415 preparations of A $\beta$ 1-42 contained two prominent bands  
 416 corresponding to trimers and tetramers as well as a monomer as  
 417 demonstrated (Fig. 1). Higher molecular weight bands corresponding  
 418 to 12- and 24-mers were also observed (Fig. 1). All bands were  
 419 identified by 4G8 antibody known to bind to an internal epitope of A $\beta$   
 420 (aa17–24). 420 Q15

421 After the third round of panning against  $\beta$ -amyloid peptide, three  
 422 VH domain-expressing phage clones (C 1.27, C 1.28 and C 2.8) and  
 423 two scFv-expressing phage clones (scFv 4.8 and scFv 3.20), with the  
 424 highest ELISA values, were selected for further studies. DNA  
 425 sequencing of positive VH domain-expressing phage clones revealed  
 426 three unique sequences which were aligned according to IMG2  
 427 numbering for V-DOMAIN in the IMG2/DNA PLOT directory (Table 1)  
 428 (Lefranc et al., 2003). As shown in Table 1, these VH domains were  
 429 430 Q15



431 Fig. 1. Biopanning of Ab fragments was done against preferentially oligomeric A $\beta$  forms. Oligomers were prepared and analyzed as described in Section 2. A $\beta$ 1-42 was incubated at 4 °C (A) and at 37 °C (B). Migration of the molecular mass standards is indicated. 432

Please cite this article as: Medecigo, M., et al., Novel amyloid-beta specific scFv and VH antibody fragments from human and mouse phage display antibody libraries, J. Neuroimmunol. (2010), doi:10.1016/j.jneuroim.2010.03.023

**Table 1**  
Germline genes/segments and CDR sequences of VH domain antibodies isolated from immune library selected on  $\beta$ -amyloid peptide.<sup>a</sup>

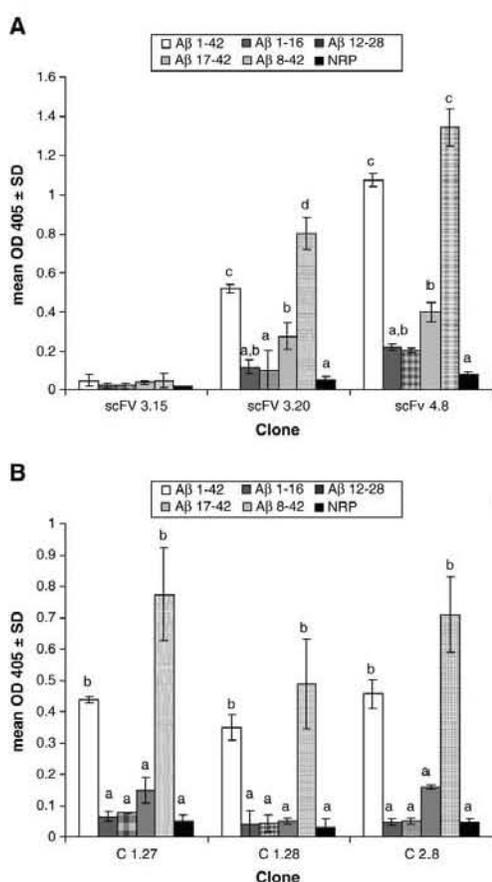
Clone	V <sub>H</sub> germline	D <sub>H</sub> germline	J <sub>H</sub> germline	HCDR1	HCDR2	HCDR3
C 1.27	IGHV3-6*02(6) <sup>b</sup>	IGHD2-14*01	IGHJ4*01 (11) <sup>b</sup>	GYSITSGYY	ISYDGSN	CARDYRYDGMIDYC
C 2.8	IGHV3-1*02(14) <sup>b</sup>	IGHD3-3*01	IGHJ1*01 (11) <sup>b</sup>	GYSITSGYS	MQYSGIT	CARGDGAYW
C 1.28	IGHV3-2*02(4) <sup>b</sup>	IGHD3-2*01	IGHJ2*01 (5) <sup>b</sup>	GYSITSDYA	ISYSGST	CARRGNLYDWW

<sup>a</sup> Mouse germline V<sub>H</sub>, D<sub>H</sub> and J<sub>H</sub> segments have been assigned as detailed in the International ImMunoGenetics Information System (IMGT). The amino acid sequences of CDRs (according to IMGT nomenclature) are shown.

<sup>b</sup> Differences in nucleotides from V<sub>H</sub> and J<sub>H</sub> germline sequences.

originated from different germline genes/segments and carried multiple mutations at both nucleotide and amino acid level. No sequence homology was found between HCDR3 regions of the clones,

and only VH framework region 3 (FR3)-derived sequences had high homology between the clones.



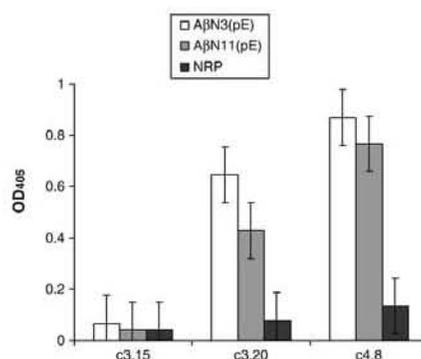
**Fig. 2.** Selected Ab fragments recognize epitopes in middle and/or C-terminus of A $\beta$ 1-42. ELISA analysis of binding of selected scFv- and VH-bearing phage clones to synthetic A $\beta$  peptides. NRP – a non-related control peptide. Data are means  $\pm$  SD of 2 independent experiments. Means denoted with different letters are statistically different ( $P < 0.05$ ). In the same assay BAM90.1 bound to A $\beta$ 12-28 (OD = 1.074  $\pm$  0.08), 4G8 bound to A $\beta$ 12-28 (OD = 1.53  $\pm$  0.02) and A $\beta$ 17-42 (OD = 1.125  $\pm$  0.03). Mouse anti-human A $\beta$ 1-42 polyclonal antibodies bound to A $\beta$ 1-42 and A $\beta$ 1-16, OD = 1.98  $\pm$  0.04 and OD = 1.99  $\pm$  0.05, respectively. Mouse anti-adjuvant serum was used as a negative control and showed OD<sub>405</sub> < 0.1.

VH- or scFv-bearing phage clones do not bind to an epitope within the immunodominant N-terminal region of A $\beta$ 1-42.

To define more precisely the binding epitope of selected antibody fragments, ELISAs were performed using full-length A $\beta$ 1-42 and four short fragments (Fig. 2). All recombinant antibodies bound to full-length A $\beta$ 1-42 and to N-truncated A $\beta$ 8-42 as well as to N-pyroglutamate modified peptides A $\beta$ N3(pE) and A $\beta$ N11(pE) (Fig. 3). Also, four of five antibodies bound moderately to A $\beta$ 17-42 (Fig. 2). These results indicate that epitope recognized by selected recombinant antibody fragments is located in the central/C-terminal part of the full-length A $\beta$ 1-42. In all experiments monoclonal anti- $\beta$ -amyloid antibodies BAM90.1 and 4G8, as well as polyclonal mouse anti-human A $\beta$ 1-42 and A $\beta$ 8-42 antibodies produced previously in our laboratory (Manoutcharian et al., 2003), were used as positive controls to test the peptide binding to well surface.

Inhibition of A $\beta$ 1-42 toxicity in vitro by selected VHs and scFvs in differentiated neuroblastoma cells

We assessed the ability of selected VHs and scFvs to inhibit A $\beta$ 1-42-induced cytotoxicity in SH-SY5Y and IMR-32 differentiated neuroblastoma cells using an XTT assay. Overnight preincubation of A $\beta$ 1-42 with VHs and scFvs prior to addition to cells resulted in a dose-dependent inhibition of the reduction in mitochondrial activity compared with a control phage (Figs. 4 and 5). A control phage expressing a non-related antibody fragment did not show any inhibition activity.



**Fig. 3.** Selected Ab fragments bound to N-truncated/pyroglutamate modified peptides A $\beta$ N3(pE) and A $\beta$ N11(pE). ELISA analysis of binding of selected clones to synthetic A $\beta$ 1-42, A $\beta$ N3(pE) and A $\beta$ N11(pE). Data are means  $\pm$  SD of 2 independent experiments.

Please cite this article as: Medecigo, M., et al., Novel amyloid-beta specific scFv and VH antibody fragments from human and mouse phage display antibody libraries, J. Neuroimmunol. (2010), doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.03.023

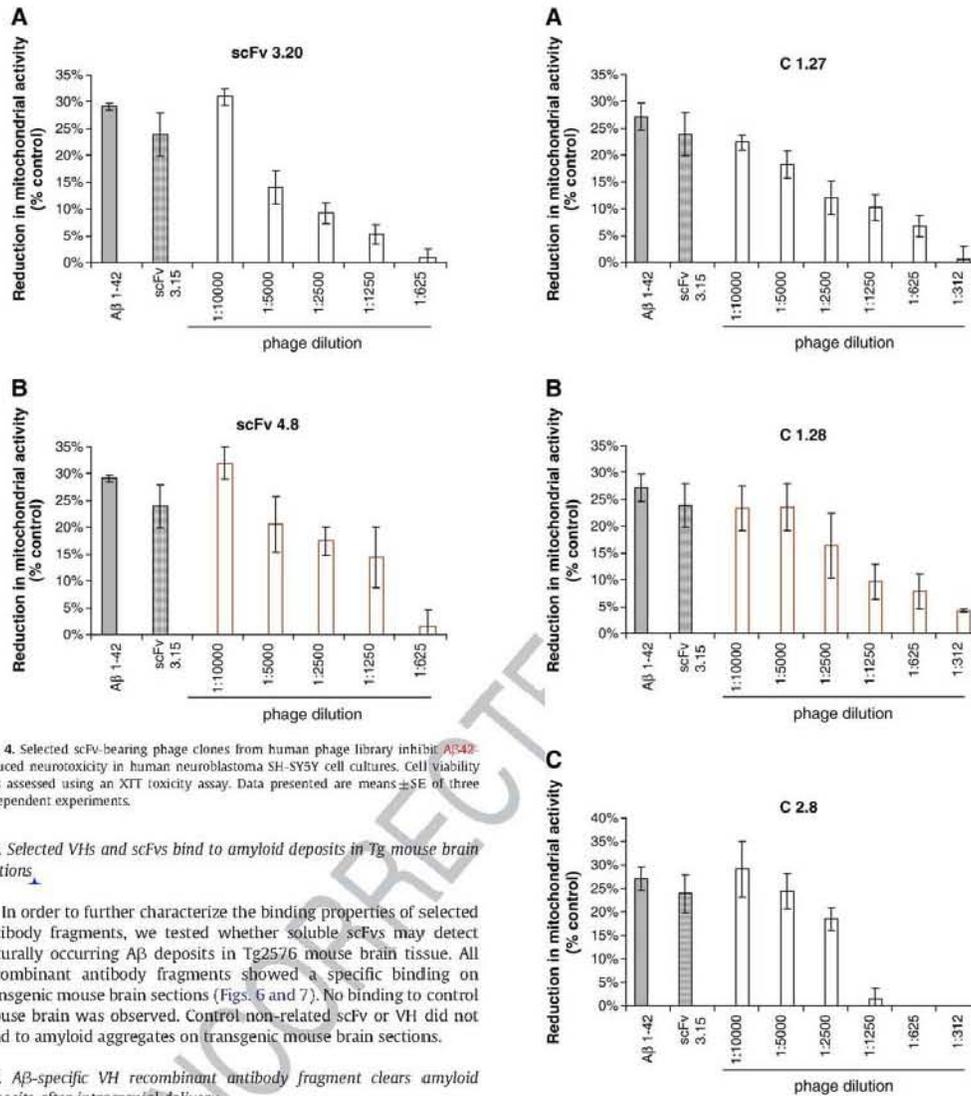


Fig. 4. Selected scFv-bearing phage clones from human phage library inhibit A $\beta$ 1-42-induced neurotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cell cultures. Cell viability was assessed using an XTT toxicity assay. Data presented are means  $\pm$  SE of three independent experiments.

#### 461 3.4. Selected VHs and scFvs bind to amyloid deposits in Tg mouse brain 462 sections

463 In order to further characterize the binding properties of selected  
464 antibody fragments, we tested whether soluble scFvs may detect  
465 naturally occurring A $\beta$  deposits in Tg2576 mouse brain tissue. All  
466 recombinant antibody fragments showed a specific binding on  
467 transgenic mouse brain sections (Figs. 6 and 7). No binding to control  
468 mouse brain was observed. Control non-related scFv or VH did not  
469 bind to amyloid aggregates on transgenic mouse brain sections.

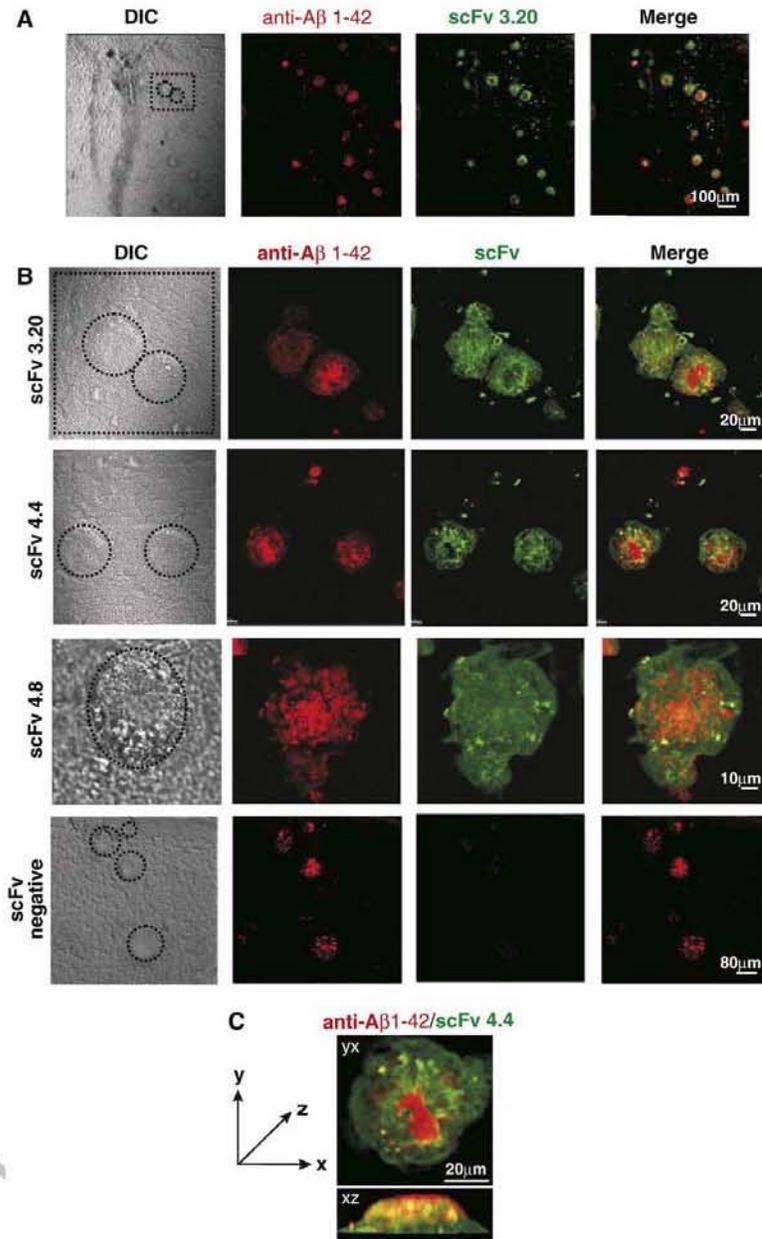
#### 470 3.5. A $\beta$ -specific VH recombinant antibody fragment clears amyloid 471 deposits after intracranial delivery

472 To demonstrate therapeutic efficacy of the discovered antibody  
473 fragments, we injected phage C1.27 bearing A $\beta$ -specific VH antibody  
474 fragment into the left hemisphere of 14-month-old APP/Tg 2576  
475 mouse. As controls we used negatively selected phage 3.17 or A $\beta$ -  
476 specific mouse monoclonal antibody 6E10, which was effective in our  
477 previous studies. Seven days later mice were sacrificed and brain  
478 sections were stained for amyloid deposit analysis (Fig. 8). Right  
479 hemisphere of the mouse brain was used for the comparison of  
480 amyloid load. In these experiments, phage 1.27 was almost as  
481 effective as a control A $\beta$ -specific monoclonal antibody (6E10) in  
482 amyloid clearance, while negative control phage did not reduce  
483 amyloid load (Fig. 8).

Fig. 5. Selected VH-bearing phage clones from immune mouse phage display library inhibit A $\beta$ 1-42-induced neurotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cell cultures. Cell viability was assessed using an XTT toxicity assay. Data presented are means  $\pm$  SE of 3 independent experiments.

#### 484 4. Discussion

485 In this study, we selected a novel set of human anti-A $\beta$ 1-42  
486 recombinant monoclonal antibodies in a single chain fragment  
487 variable (scFv) and a single-domain (VH) format from human and  
488 mouse phage display antibody libraries, respectively. We also  
489 evaluated their binding characteristics as well as their capacity to  
490 inhibit A $\beta$ 1-42 toxicity in vitro, using SH-SY5Y and IMR-32 cell



**Fig. 6.** Purified soluble scFv antibodies from human non-immune phage display library specifically recognize A $\beta$  deposits in the hippocampus of transgenic mice (Tg2576). Each panel shows, from the left: the reactivity of a rabbit anti-A $\beta$ 1-42 antibody (shown in red); the reactivity of soluble scFv fragments (shown in green); and the merge between red and green channels. (A) Low magnification provides an overview of the hippocampus in which amyloid deposits are recognized by the soluble scFv fragment (scFv3.20). (B) High magnification provides a detailed view of binding of scFv 3.20, scFv 4.4 and scFv 4.8 to amyloid deposits. Merged images illustrate clear colocalization of red and green fluorescence (in yellow) as well as only-green and only-red areas. Only a background staining is observed with a control scFv antibody. (C) Three-dimensional reconstruction of sequential confocal sections (z-stacks, taken 0.3–0.45  $\mu$ m apart in stacks) of an amyloid deposit in yx and xz planes. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Please cite this article as: Medecigo, M., et al., Novel amyloid-beta specific scFv and VH antibody fragments from human and mouse phage display antibody libraries, *J. Neuroimmunol.* (2010), doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.03.023

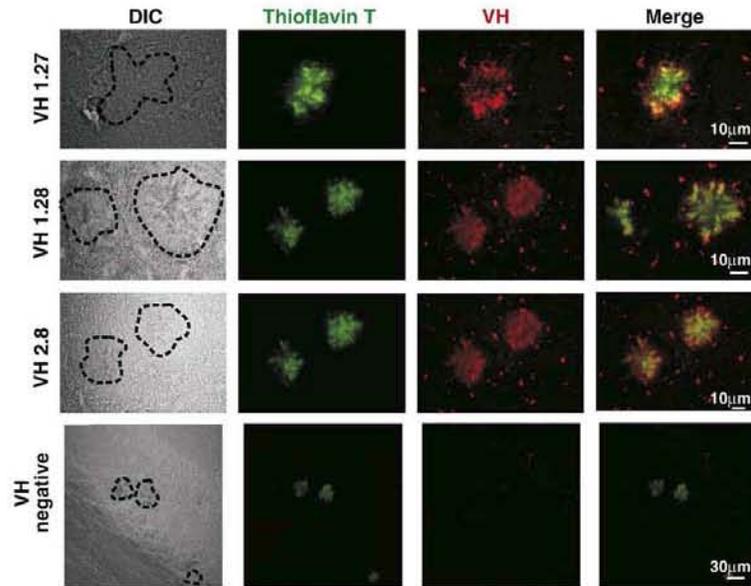
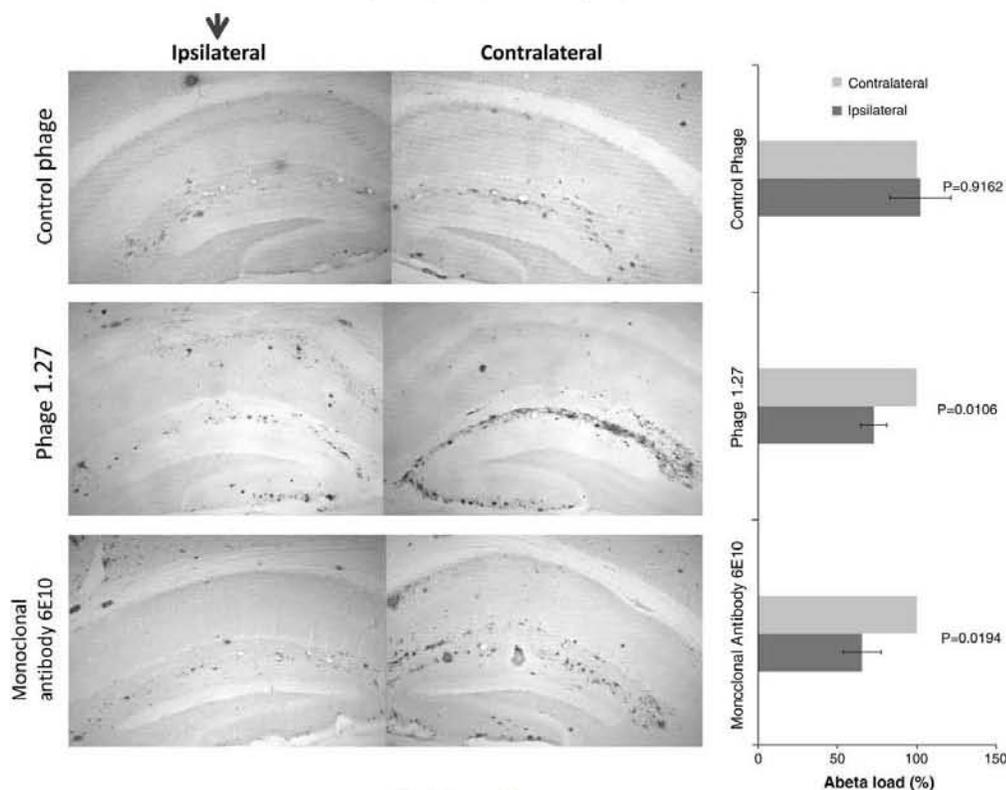


Fig. 7. Purified soluble VH antibodies from mouse immune phage display library specifically recognize A $\beta$  deposits in the hippocampus of transgenic mice (Tg2576). Each panel shows, from the left: Thioflavin T staining (shown in green); the reactivity of soluble VH fragments (shown in red); and the merge between green and red channels. Merged images illustrate clear colocalization of red and green fluorescence (in yellow). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

491 cultures. In addition, we demonstrated that these antibodies bound to  
 492 A $\beta$ 1–42 present in transgenic mouse brains and clear amyloid deposits  
 493 after intracranial administration in APP/Tg mice.  
 494 Immunotherapy approaches, both active immunization with A $\beta$   
 495 peptide, or passive transfer of anti-A $\beta$  antibodies, have shown  
 496 therapeutic efficacy in several APP/Tg mouse models, which develop  
 Q16 an AD-like amyloid plaque pathology (Brody and Holtzman, 2008), as  
 498 well as in canine and primate models of amyloidosis (Lemere et al.,  
 499 2004; Head et al., 2008). However, in some cases inflammatory  
 500 complications and deleterious side effects such as increased hemorrhages  
 501 were observed. Rapid microglial response around amyloid  
 502 pathology and interaction of microglia via Fc receptor with full-length  
 503 antibody-opsonized amyloid were shown to result in increased  
 Q17 inflammation (Lue and Walker, 2002; Koenigsnecht-Talbot et al.,  
 505 2008). However, in an interesting study by Morgan and collaborators,  
 506 minimal vascular side effects were observed after passive adminis-  
 507 tration of deglycosylated compared with intact anti-A $\beta$  antibodies  
 508 (Wilcock et al., 2006). Deglycosylation of IgG molecule results in  
 509 defective binding to Fc receptor and complement C1q leading to  
 510 decreased activation of microglia. Moreover, it has been demonstrated  
 511 that the reduction in A $\beta$  accumulation after A $\beta$ 1–42 immunization of  
 512 FcR- $\gamma$  chain knock-out Tg2576 mice was equivalent to the reduction  
 513 in A $\beta$  deposits seen in immunized age-matched FcR sufficient Tg2576  
 514 mice, suggesting that the Fc portion of the anti-A $\beta$  antibody required  
 515 for the interaction with FcR may not be necessary for A $\beta$  immu-  
 516 notherapy to be effective (Das et al., 2003). Using antibody fragments  
 517 lacking the functional Fc portion of the whole Ig molecule may  
 518 represent an alternative approach in passive immunotherapy treat-  
 519 ment strategies against AD (Bacskai et al., 2002).  
 520 Interestingly, antibody fragments selected in this study did not  
 521 bind to the amino-terminal part of A $\beta$ 1–42. These binding character-

istics of the selected antibody fragments may be important consid- 522  
 ering that an increase in both the incidence and severity of cerebral 523  
 amyloid angiopathy-associated microhemorrhages after passive im- 524  
 munization with anti-amino-terminal antibody (3D6) was observed 525  
 in previous studies (Pfeifer et al., 2002; Racke et al., 2005). In addition, 526  
 anti-amino-terminal antibodies may interact also with APP at the cell 527  
 surface, potentially interfering with its function and processing. 528  
 Analyses of samples extracted from the brain of subjects with AD 529  
 revealed the presence of low-molecular weight oligomers – dimers, 530  
 trimers and tetramers (McLean et al., 1999; Cleary et al., 2005, 531  
 Shankar et al., 2008). Importantly, these low-n aggregates were 532  
 shown to exist in both intracellular and extracellular compartments, 533  
 impair synaptic plasticity and disrupt cognitive function (Walsh et al., 534  
 2002; Cleary et al., 2005; Klyubin et al., 2005; Townsend et al., 2006; 535  
 Shankar et al., 2008). A $\beta$ 1–42 preparations used in our study 536  
 contained mainly low-n oligomers, and, importantly, antibody 537  
 fragments selected in this study neutralized the toxic effects of 538  
 these species. 539  
 Another important fact to consider for immunotherapeutic 540  
 preparation for AD is the presence of N-truncated and N-modified 541  
 forms of A $\beta$  peptide in diffuse and dense core plaques in AD and 542  
 Down's syndrome patients as well as in transgenic mouse models of 543  
 AD. However, the majority of antibodies used in previous studies 544  
 recognized the N-terminal immunodominant epitope (EFRH) of the 545  
 full-length A $\beta$ , which is absent in N-amino truncated peptides. 546  
 Recombinant antibody fragments described in our study were 547  
 shown to bind to N-truncated A $\beta$  peptides and, thus, would target a 548  
 broad range of toxic A $\beta$  species. 549  
 The field of recombinant antibody fragments has rapidly progres- 550  
 sed during the last several years because of the interest in their 551  
 therapeutic use. The discovery that camelids have functional 552



**Fig. 8.** Purified phage bearing anti-A $\beta$  antibody fragment efficiently clears amyloid deposits after intracranial delivery. Purified phage C1.27 bearing anti-A $\beta$  antibody fragment, as well as negative control phage or monoclonal 6E10 antibody, was intracranially injected into the left hippocampus of 14-month-old Tg2576 mice. Seven days later, brain sections were immunostained for A $\beta$  with polyclonal rabbit anti-A $\beta$  antibody. Original magnification was at 40 $\times$ . A $\beta$  load from the contralateral side was considered as 100%. Data are presented as mean  $\pm$  SE.

antibodies devoid of light chain let researchers to turn to single-domain antibody fragments (VHHs or nanobodies) and isolate VH domain antibodies binding to a number of antigens of interest in cancer studies and a number of infectious, inflammatory and other diseases (Harmsen and De Haard, 2007). Among advantages of VH domain antibodies are their high stability and solubility, rapid tissue penetration and recognition of hidden antigenic sites as well as cost-effective production in microorganisms. Three A $\beta$ -specific VH domain antibodies selected in this study may be of potential interest for antibody-based AD therapy.

An additional interesting application of selected VHs and scFvs, will be their expression as intracellular Abs (intrabodies) to allow the targeting of intracellular pool of A $\beta$  (Gouras et al., 2005; La Ferla et al., 2007). A number of intracellular recombinant antibodies, binding to the microtubule associated protein tau, intracellular aggregates of huntingtin and a pro-apoptotic protein Bax, were isolated and characterized from both synthetic and naive antibody libraries (Lecerf et al., 2001; Visintin et al., 2002; Gueorguieva et al., 2006). Importantly, these recombinant Ab fragments were stably expressed in mammalian cells as intrabodies and were shown to be nontoxic to the cells. In addition, the effectiveness in improving learning and memory deficits in Tg2576 mice of intracellular expression of anti-A $\beta$  scFv via adeno-associated virus was demonstrated recently by Fukuchi et al. (2006). More recently, a

panel of anti-A $\beta$  scFvs, targeting intracellular A $\beta$  oligomers was selected (Meli et al., 2009). Thus, the selection of anti-A $\beta$  recombinant intracellular antibodies may represent a new interesting approach for the development of therapeutic strategies for AD.

Finally, all soluble VHs and scFv antibodies selected in this study showed a specific reactivity on transgenic mouse brain sections. Interestingly, contrary to results obtained with a rabbit anti-A $\beta$ 1-42 antibodies, the immunoreactivity patterns with our antibody fragments showed no plaque core staining. Recently, a similar staining pattern in brain of Tg2576 mice was observed by Callaghan et al. (2008) with a mouse monoclonal anti-A $\beta$ 1-42 antibody (6E10). The binding of selected antibody fragments to naturally occurring A $\beta$  aggregates is important for considering them as promising molecules targeting amyloid deposits in human brain. Indeed, we showed that one of the tested antibody fragments cleared amyloid deposits after intracranial delivery into the Tg2576 mouse.

In conclusion, in the present study we described five recombinant antibody fragments isolated from an anti-A $\beta$  mouse immune VH domain antibody library and a naive human scFv library. Considering the great potential of antibodies or their recombinant fragments for AD immunotherapy, VHs and scFvs may be of interest as components of future antibody-based therapeutics for AD as well as other neurodegenerative diseases.

Please cite this article as: Medecigo, M., et al., Novel amyloid-beta specific scFv and VH antibody fragments from human and mouse phage display antibody libraries, J. Neuroimmunol. (2010), doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.03.023

## 599 Acknowledgments

600 Authors thank Gonzalo Acero, Carmen Calixto, Alicia Sampieri and  
601 Gabriel Orozco Hoyuela for technical assistance and Patricia De La  
602 Torre for DNA sequencing. This work was supported by grants from  
603 the NIH to GG (NIA-AG023534) and DHC (NIA-AG020241, NIA-  
604 AG00538 and NINDS-NS050895); by grants from DGAPA-UNAM,  
605 Mexico (IN200907 to GG and IN203706 to KM) and by a grant from  
606 CONACYT (58081) to G.G. M.M. was a recipient of a doctorate  
607 fellowship from CONACYT, and Posgrado en Ciencias Biológicas,  
608 UNAM, Mexico.

## 609 References

610 Acero, G., Manoucharian, K., Vasilevko, V., Munguia, M.E., Govezensky, T., Coronas, G.,  
611 Luz-Madrigal, A., Cribbs, D., Gevorkian, G., 2009. Immunodominant epitope and  
612 properties of pyroglutamate-modified A $\beta$ -specific antibodies produced in rabbits. *J.*  
613 *Neuroimmunol.* 213, 39–46.  
614 Bacskai, B.J., Kajdasz, S.T., McLellan, M.E., Games, D., Seubert, P., Schenk, D., Hyman, B.T.,  
615 2002. Non-Fc-mediated mechanisms are involved in clearance of amyloid-beta in  
616 vivo by immunotherapy. *J. Neurosci.* 22, 7873–7878.  
617 Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R.L., Games, H., Grajeda, T., Guido, K., Hu, J.,  
618 Huang, K., Johnson-Wood, K., Khan, D., Kholodenko, M., Lee, L., Lieberburg, R.,  
619 Motter, R., Nguyen, M., Soriano, F., Vasquez, N., Weiss, K., Welch, K., Seubert, P.,  
620 Schenk, D., Yednock, T., 2000. Peripherally administered antibodies against  
621 amyloid- $\beta$  peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a  
622 mouse model of Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 6, 916–919.  
623 Brody, D.L., Holtzman, D.M., 2008. Active and passive immunotherapy for neurode-  
624 generative disorders. *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 175–193.  
625 Cleary, J.P., Walsh, D.M., Hofmeister, J.J., Shankar, G.M., Kuskowski, M.A., Selkoe, D.J.,  
626 Ashe, K.H., 2005. Natural oligomers of the amyloid- $\beta$  protein specifically disrupt  
627 cognitive function. *Nat. Neurosci.* 8, 79–84.  
628 Das, P., Howard, V., Loosbrock, N., Dickson, D., Murphy, M.P., Golde, T.E., 2003. Amyloid- $\beta$   
629 immunization effectively reduces amyloid deposition in Fc $\gamma$ 2<sup>-/-</sup> knock-out mice.  
630 *J. Neurosci.* 23, 8532–8538.  
631 DeBernardis, F., Liu, H., O'Mahony, K., La Valle, R., Bartollino, S., Sandini, S., Grant, S.,  
632 Brewis, N., Tomlinson, I., Bassel, R.C., Holton, J., Rott, I.M., Cassone, A., 2007. Human  
633 domain antibodies against virulence traits of *Candida albicans* inhibit fungus  
634 adherence to vaginal epithelium and protect against experimental vaginal  
635 candidiasis. *J. Infect. Dis.* 195, 149–157.  
636 Demarest, S.J., Glaser, S.M., 2008. Antibody therapeutics, antibody engineering, and the  
637 merits of protein stability. *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* 11, 675–687.  
638 Frenkel, D., Solomon, B., Benhar, I., 2000. Modulation of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid  
639 neurotoxicity by site-directed single-chain antibody. *J. Neuroimmunol.* 106, 23–31.  
640 Fukuchi, K.-I., Tabara, K., Kim, H.-D., Maxwell, J.A., Lewis, T.L., Accavitti-Loper, M.A., Kim,  
641 H., Ponnazhagan, S., Lalonde, R., 2006. Anti-A $\beta$  single-chain antibody delivery via  
642 adeno-associated virus for treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 23,  
643 502–511.  
644 Gilman, S., Koller, M., Black, R.S., Jenkins, L., Griffith, S.G., Fox, N.C., Eisner, L., Kirby, L.,  
645 Rovira, M.B., Forette, F., Orgogozo, J.M., AN1792(QS-21)-201 Study Team, 2005.  
646 Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an  
647 interrupted trial. *Neurology* 64, 1553–1562.  
648 Haass, C., Selkoe, D.J., 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons  
649 from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 101–112.  
650 Habicht, G., Haupt, C., Friedrich, R.P., Hortschansky, P., Sachsse, C., Meierhardt, J.,  
651 Wieligmann, K., Gellermann, G.P., Brodhun, M., Gotz, J., Hübner, K.-J., Rocken, C.,  
652 Horn, U., Fandrich, M., 2007. Directed selection of a conformational antibody  
653 domain that prevents mature amyloid fibril formation by stabilizing A $\beta$   
654 protofibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 19232–19237.  
655 Harmsen, M.M., De Haard, H.J., 2007. Properties, production, and applications of  
656 camelid single-domain antibody fragments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 13–22.  
657 Hartman, R.E., Izumi, Y., Bates, K.R., Paul, S.M., Wozniak, D.F., Holtzman, D.M., 2005.  
658 Treatment with an amyloid- $\beta$  antibody ameliorates plaque load, learning deficits,  
659 and hippocampal long-term potentiation in a mouse model of Alzheimer's disease.  
660 *J. Neurosci.* 25, 6213–6220.  
661 Head, E., Pop, V., Vasilevko, V., Hill, M., Saing, T., Sarsoza, F., Nistor, M., Christie, L.A.,  
662 Milon, S., Glabe, C., Barrett, E., Cribbs, D., 2008. A two year study with fibrillar beta-  
663 amyloid (A $\beta$ ) immunization in aged canines: effects on cognitive function and  
664 brain A $\beta$ . *J. Neurosci.* 28, 3555–3565.  
665 Holliger, P., Hudson, P.J., 2005. Engineered antibody fragments and the rise of single  
666 domains. *Nat. Biotechnol.* 23, 1126–1136.  
667 Holmes, C., Boche, D., Wilkinson, D., Yadegarfar, G., Hopkins, V., Bayer, A., Jines, R.W.,  
668 Bullock, R., Love, S., Neal, J.W., Zotova, E., Nicoll, J.A.R., 2008. Long term effects of  
669 A $\beta$ 42 immunization in Alzheimer's disease: follow-up of a randomized, placebo-  
670 controlled phase I trial. *Lancet* 372, 216–223.  
671 Holt, L.J., Herring, C., Jespers, L.S., Woolven, B.P., Tomlinson, I.M., 2003. Domain  
672 antibodies: proteins for therapy. *Trends Biotechnol.* 21, 484–490.  
673 Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., Cole, G.,  
674 1996. Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic  
675 mice. *Science* 274, 99–102.  
676 Janus, C., Pearson, J., McClaurin, J., Mattews, P.M., Jiang, Y., Schmidt, S.D., Chishti, M.A.,  
677 Horne, P., Neslin, D., French, J., Mount, N.T.J., Nixon, R.A., Mercken, M., Bergeron, C.,

678 Fraser, P.E., St. George-Hyslop, P., Westaway, D., 2000. Ab peptide immunization  
679 reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease.  
680 *Nature* 408, 979–982.  
681 Khyubin, I., Walsh, D.M., Lemere, C.A., Cullen, W.K., Shankar, G.M., Betts, V., Spooner, E.T.,  
682 Jiang, L., Anwyl, R., Selkoe, D.J., Rowan, M.J., 2005. Amyloid  $\beta$  protein immunother-  
683 apy neutralizes A $\beta$  oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo. *Nat. Med.* 11,  
684 556–561.  
685 Koenigsnecht-Talboo, J., Mayer-Luehmann, M., Parsadanian, M., Garcia-Alloza, M.,  
686 Finn, M.B., Hyman, B.T., Bacskai, B.J., Holtzman, D.M., 2008. Rapid microglial  
687 response around amyloid pathology after systemic anti-A $\beta$  antibody administra-  
688 tion in PDAPP mice. *J. Neurosci.* 28, 14156–14164.  
689 Kotilinek, L.A., Bacskai, B., Westerman, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L., Hyman, B.T.,  
690 Younkin, S., Ashe, K.H., 2002. Reversible memory loss in a mouse transgenic model  
691 of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 22, 6331–6335.  
692 La Ferla, F.M., Green, K.N., Oddo, S., 2007. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's  
693 disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 499–509.  
694 Lafaye, P., Achour, I., England, P., Duyckaerts, C., Rougeon, F., 2008. Single-domain  
695 antibodies recognize selectively small oligomeric forms of amyloid beta, prevent  
696 A $\beta$ -induced neurotoxicity and inhibit fibril formation. *Mol. Immunol.* 46,  
697 695–704.  
698 Leczer, J.-M., Shirley, T.L., Zhu, Q., Kazantsev, A., Amersdorfer, P., Housman, D.E., Messer,  
699 A., Huston, J.S., 2001. Human single-chain Fv intrabodies counteract in situ  
700 huntingin aggregation in cellular models of Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad.*  
701 *Sci. USA* 98, 4764–4769.  
702 Lee, E.B., Leng, L.Z., Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.O., 2005. Meningoencephalitis associated  
703 with passive immunization of a transgenic murine model of Alzheimer's  
704 amyloidosis. *FEBS Lett.* 579, 2564–2568.  
705 Lemere, C.A., Beierschmitt, A., Iglesias, M., Spooner, E.T., Bloom, J.K., Leverone, J.F.,  
706 Zheng, J.B., Seabrook, T.J., Liguard, D., Li, D., Selkoe, D.J., Palmour, R.M., Ervin, F.R.,  
707 2004. Alzheimer's disease A $\beta$  vaccine reduces central nervous system A $\beta$  levels in a  
708 non-human primate, the Caribbean vervet. *Am. J. Pathol.* 165, 283–297.  
709 Levites, Y., Das, P., Price, D.W., Rochette, M.J., Kostura, L.A., McGowan, E.M., Murphy, M.,  
710 P., Golde, T.E., 2006. Anti-A $\beta$ 42- and anti-A $\beta$ 40-specific mAbs attenuate  
711 amyloid deposition in an Alzheimer disease mouse model. *J. Clin. Invest.* 116,  
712 193–201.  
713 Lichten, P., Mohajeri, M.H., 2008. Antibody-based approaches in Alzheimer's research.  
714 Safety, pharmacokinetics, metabolism, and analytical tools. *J. Neurochem.* 104,  
715 859–874.  
716 Lue, L.-F., Walker, D.G., 2002. Modeling Alzheimer's disease immune therapy  
717 mechanisms: interactions of human postmortem microglia with antibody-  
718 opsonized amyloid beta peptide. *J. Neurosci. Res.* 70, 599–610.  
719 Luz-Madrigal, A., Clapp, C., Aranda, J., Vaca, L., 2007. In vivo transcriptional targeting  
720 into the retinal vasculature using recombinant baculovirus carrying the human flu-  
721 A promoter. *Virology* 368, 68–72.  
722 Manoucharian, K., Acero, G., Munguia, M.E., Montero, J.A., Govezensky, T., Cao, C., Ugen,  
723 K., Gevorkian, G., 2003. Amyloid beta peptide specific single chain Fv antibodies  
724 isolated from an immune phage display library. *J. Neuroimmunol.* 145, 12–17.  
725 Manoucharian, K., Acero, G., Munguia, M.E., Becerril, B., Massieu, L., Govezensky, T.,  
726 Ortiz, E., Marks, J.D., Cao, C., Ugen, K., Gevorkian, G., 2004. Human single chain Fv  
727 antibodies and a complementarity determining region-derived peptide binding to  
728 amyloid beta 1–42. *Neurobiol. Dis.* 17, 114–121.  
729 McLean, C.A., Cherny, R.A., Fraser, F.W., Fuller, S.J., Smith, M.J., Beyreuther, K., Bush, A.I.,  
730 Masters, C.L., 1999. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of  
731 neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 46, 860–866.  
732 Mell, G., Visintin, M., Cannistraci, I., Cattaneo, A., 2009. Direct in vivo intracellular  
733 selection of conformation-sensitive antibody domains targeting Alzheimer's  
734 amyloid  $\beta$  oligomers. *J. Mol. Biol.* 387, 584–606.  
735 Munch, G., Robinson, S.E., 2002. Potential neurotoxic inflammatory responses to A $\beta$   
736 vaccination in humans. *J. Neural Transm.* 109, 1081–1087.  
737 Morgan, D., 2006. Immunotherapy for Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* 9,  
738 425–432.  
739 O'Callaghan, P., Sandwall, E., Li, J.-P., Ravid, R., Guan, Z.-Z., van Kuppevelt, T.H., Nilsson,  
740 L.N.G., Ingelsson, M., Hyman, B.T., Kalimo, H., Lindahl, U., Lannfelt, L., Zhang, X.,  
741 2008. Heparan sulfate accumulation with A $\beta$  deposits in Alzheimer's disease and  
742 Tg2576 mice is contributed by glial cells. *Brain Pathol.* 18, 548–561.  
743 Petrushina, I., Ghochikyan, A., Mkrtchyan, M., Mamikonyan, G., Movsesyan, N., Davtyan,  
744 H., Patel, A., Head, E., Cribbs, D.H., Agadjanyan, M.G., 2007. Alzheimer's disease  
745 peptide epitope vaccine reduces insoluble but not soluble/oligomeric Abeta species  
746 in amyloid precursor protein transgenic mice. *J. Neurosci.* 27, 12721–12731.  
747 Pfeifer, M., Boncristiano, S., Bondolfi, L., Stalder, A., Deller, T., Staufenbiel, M., Mathews,  
748 P.M., Jucker, M., 2002. Cerebral hemorrhage after passive anti-A $\beta$  immunother-  
749 apy. *Science* 298, 1379.  
750 Racke, M.M., Boone, L.L., Hepburn, D.L., Parsadanian, M., Bryan, M.T., Ness, D.K., Pirooz, K.S.,  
751 Jordan, W.H., Brown, D.D., Hoffman, W.P., Holtzman, D.M., Bates, K.R., Gierke, B.D., May,  
752 P.C., Paul, S.M., DeMattos, R.B., 2005. Exacerbation of cerebral amyloid angiopathy-  
753 associated microhemorrhage in amyloid precursor protein transgenic mice by  
754 immunotherapy is dependent on antibody recognition of deposited forms of amyloid  
755 beta. *J. Neurosci.* 25, 629–636.  
756 Riaño-Umbaila, L., Juares-Gonzalez, V.R., Olamendi-Portugal, T., Ortiz-Leon, M.,  
757 Possani, L.D., Becerril, B., 2005. A strategy for the generation of specific human  
758 antibodies by direct evolution and phage display. An example of a single-chain  
759 antibody fragment that neutralizes a major component of scorpion venom. *FEBS J.*  
760 272, 2591–2601.  
761 Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J.,  
762 Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, K.,  
763 Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandever, C., Walker, S., Wogulis, M.,

Please cite this article as: Medecigo, M., et al., Novel amyloid-beta specific scFv and VH antibody fragments from human and mouse phage display antibody libraries. *J. Neuroimmunol.* (2010), doi:10.1016/j.jneuroim.2010.03.023

- 764 Yednock T, Games D, Seubert P. 1999. Immunization with amyloid- $\beta$  attenuates  
765 Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400, 173–177.
- 766 Shankar, G.M., Li S, Mehta, T.H., Garcia Munoz, A, Shepardson, N.E., Smith, I, Brett, F,  
767 M., Farrell, M.A., Rowan, M.J., Lemere, C.A., Regan, C.M., Walsh, D.M., Sabatini, B.L.,  
768 Selkoe, D.J. 2008. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's  
769 brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* 14, 837–842.
- 770 Spire Jones, T.L., Mielke, M.L., Rozkalne, A., Mayer-Luehmann, M., de Calignon, A.,  
771 Bacskaï, B.J., Schenk, D., Hyman, B.T. 2009. Passive immunotherapy rapidly  
772 increases structural plasticity in a mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol.*  
773 *Dis.* 33, 213–220.
- 774 Tammer, A.H., Coia, G., Cappai, R., Fuller, S., Masters, C.L., Hudson, P., Underwood, J.R.,  
775 2002. Generation of a recombinant Fab antibody reactive with the Alzheimer's  
776 disease-related A $\beta$  peptide.
- 777 Townsend, M., Shankar, G.M., Mehta, T., Walsh, D.M., Selkoe, D.J. 2006. Effects of  
778 secreted oligomers of amyloid beta-protein in hippocampal synaptic plasticity: a  
779 potent role for trimers. *J. Physiol.* 572 (Pt2), 477–492.
- 780 Visintin, M., Settanni, G., Maritan, A., Graziosi, S., Marks, J.D., Cattaneo, A. 2002. The  
781 intracellular antibody capture technology (IAC): towards a consensus sequence  
782 for intracellular antibodies. *J. Mol. Biol.* 317, 73–83.
- 783 Walsh, D.M., Selkoe, D.J. 2007. A $\beta$  oligomers – a decade of discovery. *J. Neurochem.*  
784 101, 1172–1184.
- Weisser, N.E., Hall, J.C. 2009. Applications of single-chain variable fragment antibodies  
785 in therapeutics and diagnostics. *Biotechnol. Adv.* 27, 502–520.
- 786 Wilcock, D.M., Colton, C.A. 2008. Anti-amyloid beta immunotherapy in Alzheimer's  
787 disease: relevance of transgenic mouse studies to clinical trials. *J. Alzheimer's Dis.*  
788 15, 555–569.
- 789 Wilcock, D.M., Alamed, J., Gottschall, P.E., Grimm, J., Rosental, A., Pons, J., Ronan, V.,  
790 Symmonds, K., Gordon, M.N., Morgan, D. 2006. Deglycosylated anti-amyloid- $\beta$   
791 antibodies eliminate cognitive deficits and reduce parenchymal amyloid with  
792 minimal vascular consequences in aged amyloid precursor protein transgenic mice.  
793 *J. Neurosci.* 26, 5340–5346.
- 794 Wilcock, D.M., Gharkholonarehe, N., Van Nostrand, W., Davis, J., Vitek, M.P., Colton, C.A.,  
795 2009. Amyloid reduction by amyloid- $\beta$  vaccination also reduces mouse tau  
796 pathology and protects from neuron loss in two mouse models of Alzheimer's  
797 disease. *J. Neurosci.* 29, 7957–7965.
- 798 Wisniewski, T., Konietzko, U. 2008. Amyloid-beta immunisation for Alzheimer's  
799 disease. *Lancet Neurol.* 7, 805–811.
- 800 Zameer, A., Rasturirangan, S., Emadi, S., Nimmagadda, S.V., Sierks, M.R. 2008. Anti-  
801 oligomeric A $\beta$  single-chain variable domain antibody blocks A $\beta$ -induced  
802 toxicity against human neuroblastoma cells. *J. Mol. Biol.* 384, 917–928.
- 803

## BIBLIOGRAFÍA

- Aisen PS. 2002. The potential of anti-inflammatory drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 1:279-284.
- Aldudo J, Bullido MJ, Frank A, Valdivieso F. 1998. Missense mutation E318G of the presenilin-1 gene appears to be a nonpathogenic polymorphism. *Ann Neurol.* 44:985-986.
- Aldudo J, Bullido MJ, Valdivieso F. 1999. DGGE method for the mutational analysis of the coding and proximal promoter regions of Alzheimer's disease presenilina-1 gene: two novel mutations. *Hum Mutat.* 14:433-439.
- Allen B, Ingram E, Takao M, Smith MJ, Jakes R, Virdee K, et al. 2002. Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *J Neurosci.* 22:9340-51.
- Almeida OP, Flicker L. 2005. Association between hormone replacement therapy and dementia: is it time to forget?. *Int Psychogeriatr.* 17:155-64.
- Alzheimer A. 1907. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Zschr. F. Psychiatr. Psychisch-Gerichtl. Mediz.* 64:146-148.
- Andorfer C, Kress Y, Espinoza M, de SR, Tucker KL, Barde YA, et al. 2003. Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *J Neurochem.* 86:582-90.
- Arbabi Ghahroudi, et al. 1997. Selection and identification of Single-domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett.* 414:521-26.
- Arrasate M, Pérez M, Ávila J. 2000. Tau dephosphorylation at tau-1 site correlates with its association to cell membrane. *Neurochem Res.* 25:43-50.
- Arrasate M, Pérez M, Valpuesta JM, Ávila J. 1997. Role of glycosaminoglycans in determining the helicity of paired helical filaments. *Am J Pathol.* 151:1115-1122.
- Atwood CS, Obrenovich ME, Liu T, Chan H, Perry G, Smith MA, Martins RN. 2003. Amyloid-beta: a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid-beta. *Brain Res Brain Res Rev.* 43:1-16.
- Ávila J, Lim F, Moreno F, Belmonte C, Cuello AC. 2002. Tau function and dysfunction in neurons: its role in neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol.* 25:213-231.
- Azzazy HME y Highsmith Jr. WE. 2002. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem.* 35:425-445.
- Bacskai BJ, et al. 2002. Non-Fc mediated mechanisms are involved in clearance of amyloid-beta in vivo by immunotherapy. *J. Neuroscience.* 22:7873-7878.
- Bai J, et al. 2003. Inhibition of Tat-mediated transactivation and HIV-1 replication by human anti-hCyclin T1 intrabodies. *J Biol Chem.* 278:1433-1442.
- Bard F, et al. 2000. Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature Medicine.* 6:916-919.
- Bard F, et al. 2003. Epitope and isotype specificities of antibodies to beta-amyloid peptide for protection against Alzheimer's disease-like neuropathology. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:2023-2028.
- Barnham KJ, et al. 2003. Structure of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein copper binding domain. *J Biol Chem.* 278:17401-17407.
- Baudier J, Lee SH, Cole RD. 1987. Separation of the different microtubule-associated tau protein species from bovine brain and their mode II phosphorylation by Ca<sup>2+</sup>/phospholipid-dependent protein kinase C. *J Biol Chem.* 262:17584-17590.
- Behr, et al. 1996. Regulation of amyloid protein precursor binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I. *J. Biol. Chem.* 271:1613-20.
- Bond C, Marsters J y Sidhu S. 2003. Contributions of CDR3 to VHH Domain Stability and the Design of Monobody Scaffolds for Native Antibody Libraries. *J Mol Biol.* 332:643-655.
- Borchardt T, et al. 1999. Copper inhibits  $\beta$ -amyloid production and stimulates the non-amyloidogenic pathway of amyloid precursor protein secretion. *Biochem J.* 344:461-467.

- Borchelt DR, Ratovitski T, van LJ, Lee MK, Gonzales V, Jenkins NA, et al. 1997. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron*. 19:939-45.
- Bradbury A y Marks J. 2004. Antibodies from Phage Antibody Libraries. *Journal of Immunological Methods*. 290:29-49.
- Brandt R, Leger J, Lee G. 1995. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's aminoterminal projection domain. *J Cell Biol* 131:1327-1340.
- Bre MH, Karsenti E. 1990. Effects of brain microtubule-associated proteins on microtubule dynamics and the nucleating activity of centrosomes. *Cell Motil Cytoskeleton*. 15:88-98.
- Breen, et al. 1991. Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell- surface adhesion. *J. Neurosci. Res*. 28:90-100.
- Brekke O y Løset G. 2003. New technologies in therapeutic antibody development. *Current Opinion in Pharmacology* 3:544–550
- Brody DL y Holtzman DM. 2008. Active and passive immunotherapy for neurodegenerative disorders. *Annu. Rev. Neurosci*. 31, 175-193.
- Burke WJ, Folks DG, Roccaforte WH, et al. 1994. Serotonin reuptake inhibitors for the treatment of coexisting depression and psychosis in dementia of the Alzheimer type. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2:352-354.
- Cai X y Garen A. 1997. Comparison of Fusion Phage Libraries Displaying VH or Single-Chain Fv Antibody Fragments Derived from the Antibody Repertoire of a Vaccinated Melanoma Patient as a Source of Melanoma. Specific Targeting Molecules. *Processes Natural Academic Science*. 94:9261-9266.
- Cai y Garen. 1996. A melanoma-specific VH antibody cloned from a fusion phage library of a vaccinated melanoma patient. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93 :6280-85.
- Chen G, et al. 2001. A learning deficit related to age and  $\beta$ -amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature*. 408:975-979.
- Chen QS, et al. 2000. Impairment of hippocampal long-term potentiation by Alzheimer  $\beta$ -amyloid peptides. *J. Neurosci. Res*. 60:65-72.
- Cheng IH, Palop JJ, Espósito LA, Bien-Ly N, Yan F, Mucke L. 2004. Aggressive amyloidosis in mice expressing human amyloid peptides with the Arctic mutation. *Nat Med*. 10:1190-2.
- Chin J, Palop JJ, Puolivali J, Massaro C, Bien-Ly N, Gerstein H, et al. 2005. Fyn kinase induces synaptic and cognitive impairments in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 25:9694-703.
- Citron Martin. 2004. Strategies for Disease Modification in Alzheimer 's disease. *Nature Neuroscience* 5:677-685.
- Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, Ashe KH. 2005. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat. Neurosci*. 8, 79-84.
- Correias I, Díaz-Nido J, Ávila J. 1992. Microtubule-associated protein tau is phosphorylated by protein kinase C on its tubulin binding domain. *J Biol Chem*. 267:15721-15728.
- Cruts M, Van Broeckhoven C. 1998. Presenilin mutations in Alzheimer's disease. *Hum Mutat*. 11:183-190.
- Das P, Howard V, Loosbrock N, Dickson D, Murphy MP, Golde TE. 2003. Amyloid –  $\beta$  Immunization Effectively Reduces Amyloid Deposition in FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup> Knock-Out Mice. *The Journal of Neuroscience* 23:24:832-838.
- Davies P, Maloney AJ. 1976. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*. 2(8000):1403.
- De Genst E, Saerens D, Muyldermans S, Conrath K. 2006. Antibody repertoire development in camelids. *Dev Comp Immunol*.30:187-98.
- De Strooper B y Annaert W. 2000. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci*. 113:1857-1870.
- DeMattos RB, et al. 2001. Peripheral anti-A $\beta$  antibody alters CNS and plasma A $\beta$  clearance and decreases brain Abeta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98:8850-8855.
- Desmyter, et al. 1996. Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. *Nat. Struct. Biol* 3:803-11.

- Devanand D, Sackheim HA, Brown R, et al. 1989. A pilot study of haloperidol treatment of psychosis and behavioral disturbance in Alzheimer's disease. *Arch Neuro.* 146:854-857.
- Dewachter I y Leuven FV. 2002. Secretases as targets for the treatment of Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 1:409.
- Dickson DW. 1997. The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol.* 56:321-339.
- Dodart JC, et al. 2002. Immunization reverses memory deficits without reducing brain A $\beta$  burden in Alzheimer's disease model. *Nature Neuroscience.* 5:452-457.
- Dodel RC, Hampel H, Duc Y. 2003. Immunotherapy for Alzheimer's disease. *Lancet Neurology.* 2:215.
- Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW. 1992. Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell.* 3:1141-1154.
- Drewes G, Lichtenberg KB, Doring F, et al. 1992. Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *Embo J.* 11:2131-2138.
- Drewes G: Presenilin complex grows again. [www.alzforum.org](http://www.alzforum.org) 3 de enero de 2003.
- Drubin DG, Kirschner MW. 1986. Tau protein function in living cells. *J Cell Biol.* 103:2739-2746.
- Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Pérez-Tur J, et al. 1996. Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature.* 383:710-3.
- Eikelenboom, P. et al. 1994. Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 15:447-50.
- Engelhart MJ, et al. 2002. Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *JAMA.* 287:3223-29.
- Fang Q, Kannapeli C, Man Fu S, Xu S y Gaskin F. 1995. VH and VL Gene Usage by Anti-  $\beta$ -Amyloid Autoantibodies in Alzheimer's Disease: Detection of Highly Mutated V Regions in both Heavy and Light Chains. *Clinical Immunology and Immunopathology* 79:2;159-157.
- Francis R, et al. 2002. aph-1 and pen-2 required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev. Cell.* 3:85-97.
- Frautschy SA, et al. 1998. Microglial response to amyloid plaques in APP<sub>SW</sub> transgenic mice. *Am J Pathol.* 152:307-17.
- Frenkel D y Solomon B. 2002. Filamentous phage as vector-mediated antibody delivery to the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:5675-79.
- Frenkel D, Solomon B, Benhar I. 2000. Modulation of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid neurotoxicity by site-directed single-chain antibody. *J. Neuroimmunol.* 106:23-31.
- Frenken, et al. 2000. Isolation of antigen specific llama VHH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* 78:11-21.
- Fukuchi KI, Tahara K, Kim HD, Maxwell JA, Lewis TL, Accavitti-Loper MA, Kim H, Ponnazhagan S, Lalonde R, 2006. Anti-A $\beta$  single-chain antibody delivery via adeno-associated virus for treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 23:502-511.
- Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, et al. 1995. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature.* 373:523-7.
- Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, et al (2). 1995. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature.* 373:523-7.
- Gaskin F, Finley J, Fang Q, Xu S y Fu SM 1993. Human antibodies reactive with beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *J. Exp. Med.* 177:1 181-1 186.
- Geula C, et al. 1998. Aging renders the brain vulnerable to amyloid  $\beta$ -protein neurotoxicity. *Nature Med.* 4:827-31.
- Gevorkian G, et al. 2004. Mimotopes of conformational epitopes in fibrillar  $\beta$ -amyloid. *J. Neuroimmunology.* 156:10-20.
- Ghiso, et al. 1992. A 109-aminoacid C-terminal fragment of Alzheimer's disease amyloid precursor protein contains a sequence, RHDS, that promotes cell adhesion. *Biochem. J.* 288:1053-59.
- Ghosh AK, Hong L, Tang J. 2002. Beta-secretase as a therapeutic target for inhibitor drugs. *Curr Med Chem.* 9:1135-1144.
- Goedert M, Hasegawa M, Jakes R, Lawler S, Cuenda A, Cohen P. 1997. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. *FEBS Lett.* 409:57-62.

- Goldgaber D, Lerman MI, McBride OW, Saffiotti U, Gajdusek DC. 1987. Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science*. 235:877-880.
- Gómez-Isla T y Irizarry M. 2002. Transgenic mouse models and Alzheimer's disease. En: Boller F, Kappa S (eds.). *Handbook of Neuropsychology*.
- Gouras GK, et al. 2005. Intraneuronal A $\beta$ <sub>42</sub> accumulation in human brain. *Am. J. Pathol.* 156:15-20.
- Gralle M, et al. 2006. Solution conformation and heparin-induced dimerization of the full-length extracellular domain of the f $\zeta$ human amyloid precursor protein. *J Mol Biol.* 357:493-508.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci US.* 83:4913-4917.
- Gueorguieva D, Li S, Walsh N, Mukerji A, Tanha J, Pandey S. 2006. Identification of single-domain, Bax-specific intrabodies that confer resistance to mammalian cells against oxidative-stress-induced apoptosis. *FASEB J.*20:2636-8.
- Gunawardena S, Goldstein L. S. 2001. Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in *Drosophila*. *Neuron.* 32:389-401.
- Haas C, et al. 1992b. Amyloid  $\beta$ -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature.* 359:322-325.
- Haas C, Doo EH, Mellon A, Hung AY, Selkoe DJ. 1992a. Targeting of cell-surface  $\beta$ -amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature.* 357:500-503.
- Haber y Richards. 1963. The specificity of antigenic recognition of antibody heavy chain. *Proc. R. Soc. London Ser. B.* 166:176-87.
- Hammers-Casterman, et al. 1993. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature.* 363:446-48.
- Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, Anderton BH. 1992. Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett.* 147:58-62.
- Hardy J & Allsop D. 1991. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 12: 383388.
- Hardy JA y Selkoe DJ. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 297:353-356.
- Harmsen MM, De Haard HJ. 2007. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 13-22.
- Hartley DM, et al.1999. *J. Neurosci.* 19:8876-84.
- Head E, et al. 2008. A two-year study with fibrillar beta-amyloid (A $\beta$ ) immunization in aged canines: effects on cognitive function and brain A $\beta$ . *J. Neurosci.* 28, 3555-3566.
- Herzig MC, Winkler DT, Burgermeister P, Pfeifer M, Kohler E, Schmidt SD, et al. 2004. A $\beta$  is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis. *Nat Neurosci.* 7:954-60.
- Hof PR y Morrison JH. 1994. The cellular basis of cortical disconnection in Alzheimer disease and related dementing conditions. In: Terry RD, Katzman R, Bick KL (Eds.). *Alzheimer Disease*. Raven. New York. pp. 197-229.
- Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, et al. 1998. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med.* 4:97-100.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, et al. 1996. Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274:99-102.
- Hsieh H, et al. 2006. AMPAR removal underlies A $\beta$ -induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron.* 52:831-43.
- Huse JT, Doms RW. 2000. Closing in on the amyloid cascade: recent insights into the cell biology of Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.* 22:81-98.
- Huse JT, et al. 2000. Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *J. Biol. Chem.* 275:33729-33737.
- Ihara Y, Nukina N, Miura R, Ogawara M. 1986. Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J Biochem.* 99:1807-1810.

- Imahori K, Uchida T. 1997. Physiology and pathology of tau protein kinases in relation to Alzheimer's disease. *J Biochem.* 121:179-188.
- Irizarry MC, et al. 1997. APPSW transgenic mice develop age related amyloid deposits and neuropil abnormalities but no neuronal loss in CA1. *J Neuropathol Esp Neurol.* 56:965-73.
- Iwatsubo T, et al. 1994. Visualization of A beta 42(43) precedes A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron.* 13:45-53.
- Jang, et al. 1996. Heavy chain dominance in the binding of DNA by a lupus mouse monoclonal autoantibody. *Mol. Immunol.* 33:197-210.
- Janus C, et al. 2000. A $\beta$  peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature.* 408:979-982.
- Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr. 1993. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry.* 32:4693-4697.
- Jaton, et al. 1968. Recovery of antibody activity upon reoxidation of completely reduced polyalanyl heavy chain and its Fd fragment derived from anti-2,4-dinitrophenyl antibody. *Biochemistry.* 7:4185-95.
- Jensen MT, et al. 2005. Lifelong immunization with human  $\beta$ -amyloid (1-42) protects Alzheimer's transgenic mice against cognitive impairment throughout aging. *Neuroscience.* 130:667-684.
- Jin L, et al. 1994. Peptides containing the RERMS sequence of amyloid  $\beta$ /A4 protein precursor bind cell surface and promote neurite extension. *J. Neurosci.* 14:5461-70.
- Kamal A, et al. 2001. Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing  $\gamma$ -secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature.* 414:643-648.
- Kamenetz F, et al. 2003. APP processing and synaptic function. *Neuron.* 37:925-37.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, et al. 1987. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature.* 325:733-736.
- Klein WL. 2002. A $\beta$  toxicity in Alzheimer's disease: glubular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem. Int.* 41:345-352.
- Klyubin I, et al. 2005. Amyloid  $\beta$  protein immunotherapy neutralizes A $\beta$  oligomers that disrupt synaptic plasticity *in vivo*. *Nature medicine.* 11:556-61.
- Klyubin I, et al. 2008. Amyloid  $\beta$  protein dimer-containing human CSF disrupts synaptic plasticity: prevention by systemic passive immunization. *Neurobiology of Disease.* 28:4231-4237.
- Koenigsknecht-Talboo J, et AL. 2008. Rapid microglial response around amyloid pathology after systemic anti-Ab antibody administration in PDAPP mice. *J. Neurosci.* 28, 14156-14164.
- Kokubo H, Kaye R, Glabe C y Yamaguchi H. 2005. Soluble  $\beta$ A Oligomers ultrastructurally Localize to Cell Processes and Might be Related to Synaptic Dysfunction in Alzheimer's Disease Brain. *Brain Research* 1031:222-228.
- Kontush, et al. 2001. Amyloid beta is an antioxidant for lipoproteins in cerebrospinal fluid and plasma, *Free Radic. Biol. Med.* 30:119-128.
- Kovacs DM, et al. 1996. Alzheimer-associated presenilinas 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nat. Med.* 2:224-229.
- La Ferla FM, Green KN, Oddo S. 2007. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's Disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 499-509.
- Lacor PN, et al. 2004. Synaptic targeting by Alzheimer's related amyloid  $\beta$  oligomers. *J. Neurosci.* 24:10191-10200.
- Lambert MP, et al. 1998. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1 to 42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:6448-53.
- Lambert MP, et al. 2001. Vaccination with soluble A $\beta$  oligomers generates toxicity-neutralizing antibodies. *J. Neurochem.* 79:595605.
- Lamour Y. 1994. Alzheimer's disease: a review of recent findings. *Biome and Pharmacother.* 48:312-318.
- Lerner AJ. 1999. Hypothesis: amyloid  $\beta$ -peptides truncated at the N-terminus contribute to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging.* 20:65-69.
- Lecerf JM, et al. 2001. Human single-chain Fv intrabodies counteract in situ huntingtin aggregation in cellular models of Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4764-4769.

- Leissring MA, et al. 2002. A physiologic signaling role for the gamma-secretase-derived intracellular fragment of APP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:4697-4702.
- Lemere CA, Blustzjan JK, Yamguchi H, et al. 1996. Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and ApoE in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiol Dis.* 3:16-32.
- Lemere CA, et al. 2004. Alzheimer's disease A $\beta$  vaccine reduces central nervous system A $\beta$  levels in a non-human primate, the Caribbean vervet. *Am. J. Pathol.* 165, 283-297.
- Lemere CA, Lopera F, Kosik KS, et al. 1996. The E280A presenilin1 Alzheimer mutation produces increased Abeta42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nat Med.* 2:1146-1150.
- Lesne S, et al. 2006. A specific amyloid- $\beta$  assembly in the brain impairs memory. *Nature.* 440:352-57.
- Levy-Lahad E, et al. 1995. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science.* 269:973-977.
- Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, et al. 2001. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science.* 293:1487-91.
- Link CD. 1995. Expression of human  $\beta$ -amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:9368-9372.
- Liu R, et al. 2004. Single chain variable fragments against beta-amyloid (Abeta) can inhibit Abeta aggregation and prevent Abeta-induced neurotoxicity. *Biochemistry.* 43:6959-67.
- Lovestone S, Anderton B, Betts J, Dayanandan R, Gibb G, Ljungberg C, et al. 2001. Apolipoprotein E gene and Alzheimer's disease: is tau the link? *Biochem Soc Symp.* 67:111-120.
- Lucas JJ, Hernández F, Gómez-Ramos P, Morán MA, Hen R, Ávila J. 2001. Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *Embo J.* 20:27-39.
- Lue LF, Walker DG. 2002. Modeling Alzheimer's disease immune therapy mechanisms: interactions of human postmortem microglia with antibody-opsonized amyloid beta peptide. *J. Neurosci. Res.* 70, 599-610.
- Ma B y Nussinov R. 2002. Stabilities and conformations of Alzheimer's  $\beta$  amyloid peptide oligomers (Abeta 16-22, Abeta 16-35, and Abeta 10-35): sequence effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:14126-14131.
- Maccioni RB, Vera JC, Domínguez J, Ávila J. 1989. A discrete repeated sequence defines a tubulin binding domain on microtubule-associated protein tau. *Arch Biochem Biophys.* 275:568-579.
- Mahley RW. 1988. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science.* 240:622-630.
- Manoutcharian K, et al. 2003. Amyloid-beta peptide specific single Chain Fv antibodies isolated from an immune phage display library. *J. Neuroimmunol.* 145:12-17.
- Manoutcharian K, et al. 2004. Human single chain Fv antibodies and a complementary determining region-derived peptide binding to amyloid-beta 1-42. *Neurobiol. Dis.* 17:114-21.
- Mashiah E, et al, 1993. Re-evaluation of the structural organization of neuritic plaques in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 52:619-632.
- Mattila KM, Forsell C, Pirttila T, Rinne JO, Lehtimaki T, Roytta M, et al. 1998. The Glu318Gly mutation of the presenilin-1 gene does not necessarily cause Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 44:965-967.
- Mattson M, et al. 1993. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the  $\beta$ -amyloid precursor protein. *Neuron.* 10:243-54.
- Mattson M. 1997. Cellular actions of  $\beta$ -amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol. Rev.* 77:1081-1132.
- Mayeux R. 2003. Epidemiology of neurodegeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 26:81-104.
- McGeer PL, McGeer EG. 1995. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev.* 21:195-218.
- McGowan E, Pickford F, Kim J, Onstead L, Eriksen J, Yu C, et al. 2005. Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. *Neuron.* 47:191-9.
- McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller S, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL. 1999. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 46, 860-866.

- Meli G, et al. 2009. Direct in vivo intracellular selection of conformation-sensitive antibody domains targeting Alzheimer's amyloid- $\beta$  oligomers. *J. Mol. Biol.* 387, 584-606.
- Miyata M, Smith JD. 1996. Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nat Genet.* 14:55-61.
- Morgan D, et al. 2000. A $\beta$  peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature.* 408:982-985.
- Morgan D. 2006. Immunotherapy for Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 9, 425-432.
- Morris MC, et al. 2002. Dietary intake of antioxidant nutrients and the risk of incident Alzheimer disease in a biracial community study. *JAMA.* 287:3230-37.
- Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, et al. 2000. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci.* 20:4050-8.
- Mulnard RA, et al. 2000. Estrogen replacement therapy for treatment of mild to moderate Alzheimer's disease: a randomized controlled trial. Alzheimer's Disease Cooperative Study. *JAMA.* 283:1007-15.
- Multhaup G, et al. 1995. Characterization of the high affinity heparin binding site of the Alzheimer's disease  $\beta$ A4 amyloid precursor protein (APP) and its enhancement by zinc (II). *J. mol. Recognit.* 8: 247-257.
- Munch G y Robinson R. 2002. Potential neurotoxic inflammatory responses to Ab vaccination in humans. *J. Neural. Transmission.* 149:1081-1087.
- Muyldermans, et al. 2001. Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. *Trends Biochem. Sci.* 26:230-35.
- Naslund J, et al. 1994. Relative abundance of Alzheimer A $\beta$  amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proc. Natl. Acad. Scie.* 91:8378-8382.
- Neve RL, Finch EA, Dawes LR. 1998. Expression of the Alzheimer amyloid precursor gene transcripts in the human brain. *Neuron,* 1:669-677.
- Nishimoto I, et al. 1993. Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature.* 362:75-79.
- Nunan J, Small DH. 2000. Regulation of APP cleavage by alpha, beta and gamma-secretases. *FEBS Lett.* 483:6-10.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, et al. 2003. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron.* 39:409-21.
- Oddo S, et al. 2006. Temporal profile of amyloid- $\beta$  oligomerization in an in vivo model of Alzheimer disease: a link between A $\beta$  and tau pathology. *J. Biol. Chem.* 281:1599-1604.
- Ohsawa I, et al. 1997. The amino-terminal region of amyloid precursor protein is responsible for neurite outgrowth in rat neocortical explants culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 236:59-65.
- Panda D, Goode BL, Feinstein SC, Wilson L. 1995. Kinetic stabilization of microtubule dynamics at steady state by tau and microtubule-binding domains of tau. *Biochemistry.* 34:11117-11127.
- Pappolla MA, et al. 1998. Evidence of oxidative stress and in vivo neurotoxicity of beta-amyloid in transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a chronic oxidative paradigm for testing antioxidant therapies in vivo. *Am J Pathol.* 152:871-7.
- Parvathy S, et al. 1999. Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by alpha-secretase occurs at the surface of neuronal cells. *Biochemistry.* 38:1680-1685.
- Petrushina I, Ghochikyan A, Mktrichyan M, Mamikonyan G, Movsesyan N, Davtyan H, Patel A, Head E, Cribbs DH, Agadjanyan MG. 2007. Alzheimer's disease peptide epitope vaccine reduces insoluble but not soluble/oligomeric Abeta species in amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci.* 27:12721-31.
- Pfeifer M, et al. 2002. Cerebral hemorrhage after passive anti-A $\beta$  immunotherapy. *Science.* 298:1379.
- Pike CJ, Overman MJ y Cotman CW. 1995. Amino-terminal deletions enhance aggregation of beta-amyloid peptides in vitro. *J. Biol. Chem.* 270:23895-23898.
- Pike CJ, et al. 1991. In vitro aging of  $\beta$ -amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res.* 563:311-14.

- Poirier J. 1994. Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 17:525-530.
- Poirier J. 1994. Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 17:525-530.
- Poirier J. 2000. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. A role in amyloid catabolism. *Ann NY Acad Sci.* 924:81-90.
- Price DL y Sisodia SS. 1998. Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. *Annu Rev Neurosci.* 21, 479-505.
- Racke MM, et al. 2005. Exacerbation of cerebral amyloid angiopathy-associated microhemorrhage in amyloid precursor protein transgenic mice by immunotherapy is dependent on antibody recognition of deposited forms of amyloid beta. *J. Neurosci.* 25, 629-636.
- Ramsden M, Kotilinek L, Forster C, Paulson J, McGowan E, SantaCruz K, et al. 2005. Age-dependent neurofibrillary tangle formation, neuron loss, and memory impairment in a mouse model of human tauopathy (P301L). *J Neurosci.* 25:10637-47.
- Rea TD, et al. 2005. Statin use and the risk of incident dementia: the Cardiovascular Health Study. *Arch Neurol.* 62:1047-51.
- Reiter Y, Schuck P, Boyd L y Plaksin D. 1999. An Antibody Single-Domain Phage Display Library of a Native Heavy Chain Variable Region: Isolation of Functional Single-Domain VH Molecules with a Unique Interface. *Journal of Molecular Biology* 290:685-698.
- Riaño-Umbarila L, et al. 2005. A strategy for the generation of specific human antibodies by direct evolution and phage display. An example of a single-chain antibody fragment that neutralizes a major component of scorpion venom. *The FEBS J.* 272,2591-2601.
- Robakis NK, Wisniewski HM, Jenkins EC, Devine-Gage EA, Houck GE, Yao XL, et al. 1987. Chromosome 21q21 sublocalisation of gene encoding beta-amyloid peptide in cerebral vessels and neuritic (senile) plaques of people with Alzheimer disease and Down syndrome. *Lancet.* 1:384-385.
- Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, et al. 1995. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature.* 376:775-778.
- Rossjohn J, et al. 1999. Crystal structure of the N-terminal growth factor-like domain of Alzheimer's amyloid precursor protein. *Nat Struct Biol.* 6:327-331.
- Roth M. 1986. The association of clinical and neurological findings and its bearing on the classification and aetiology of Alzheimer's disease. *Br Med Bull.* 42:42-50.
- Saerens D, et al. 2005. Identification of a Universal VHH Framework to Graft Non-canonical Antigen-binding Loops of Camel Single-domain Antibodies. *Journal of Molecular Biology.* 352: 597-607
- Saido RC, et al. 1995. Dominant and differential deposition of distinct  $\beta$  amyloid peptide species,  $A\beta_{N3(PE)}$  in senile plaques. *Neuron.* 14:457-466.
- Sambrook J y Russell DW 2001. *Molecular Cloning. A laboratory Manual.* 3<sup>rd</sup> edition. Cold spring Harbor Laboratory Press. N.Y. 1.25-1.26 pp.
- Santamaría H. 2003. Phage Display y su aplicación en el diagnóstico clínico. *Revista de Investigación Clínica.* 55:711-718.
- Sasaki H, Muramoto O, Kanazawa I, Arai H, Kosaka K, Iizuka R. 1986. Regional distribution of amino acid transmitters in postmortem brains of presenile and senile dementia of Alzheimer type. *Ann Neurol.* 19:263-9.
- Schenk D, et al. 1999. Immunization with amyloid -  $\beta$  attenuates Alzheimer- Disease-Like Pathology in the PDAPP Mouse. *Nature* 400:173-177.
- Schenk D, et al. 1999. Immunization with amyloid- $\beta$  attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature.* 400:173-177.
- Schenk D. 2002. Amyloid-  $\beta$  Immunotherapy for Alzheimer's Disease: the end of the beginning. *Nature Neuroscience* 3: 824-828.
- Scheuermann S, et al. 2001. Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 276:33923-29.
- Scheuner D, et al. 1996. Secreted amyloid beta protein similar to that in senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Med.* 2:864-70.

- Schier R, et al. 1995. *In vitro* and *in vivo* characterization of a human anti-c-erbB-2 single-chain Fv isolated from a filamentous phage antibody library. *Immunotechnol.* 1:73-81.
- Scott CW, Spreen RC, Herman JL, et al, 1993. Phosphorylation of recombinant tau by cAMP-dependent protein kinase. Identification of phosphorylation sites and effect on microtubule assembly. *J Biol Chem.* 268:1166-1173.
- Selkoe DJ. 1997. Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments. *Science.* 275:630-631.
- Selkoe DJ. 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Phys. Rev.* 81:741-766.
- Sergeant N, et al. 2003. Truncated beta-amyloid peptide species in the pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach. *J. Neurochem.* 85:1581-1591.
- Shankar GM, et al. 2008. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* 14, 837-842.
- Sidhu S. 2001. Engineering M13 for phage display. *Biomolecular Engineering.* 18:57-63.
- Sigurdsson EM, et al. 2001. Immunization with a nontoxic/nonfibrillar amyloid- $\beta$  homologous peptide reduces Alzheimer's disease-associated pathology in transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 159:439-447.
- Sisodia SS. 1992. Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane bound protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:6075-6079.
- Small SA y Mayeux R. 2000. En Rowland LP (ed): *Merrit neurología.* 10 ed. McGraw-Hill Interamericana, México.
- Smith DG, et al. 2007. The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid beta peptide. *Biochim Biophys Acta.* 1768:1976-1990.
- Smith MA, et al. 1998. Amyloid-beta deposition in Alzheimer transgenic mice is associated with oxidative stress. *J Neurochem.* 70:2212-5.
- Soba P, et al. 2005. Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J.* 24:3624-34.
- Solomon B, et al. 1996. Monoclonal antibodies inhibit *in vitro* fibrillar aggregation of the Alzheimer  $\beta$ -amyloid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:452-455.
- Solomon B, et al. 1997. Disaggregation of Alzheimer b-amyloid by sitedirected mAb. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:4109-4112.
- Standaert DG, Young AB. 2001. Treatment of central nervous system degenerative disorders. En: Goodman, Gilman (eds.): *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10a ed. McGraw-Hill, Madrid. 549-568.
- Stephan A, et al. 2001. Generation of aggregated beta-amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits. *J Neurosci.* 21:5703-14.
- Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, et al. 1997. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:13287-92.
- Suzuki, et al. 1994. High tissue content of soluble  $\beta$ 1-40 is linked to cerebral amyloid angiopathy. *Am J Pathol.* 145:452-460.
- Takasugi N, et al. 2003. The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature.* 422:438-441.
- Tammer AJ, et al. 2002. Generation of a recombinant Fab antibody reactive with the Alzheimer's disease-related A $\beta$  peptide. *Clin. Exp. Immunol.* 129:453-63.
- Tanaka S, et al. 1988. Three types of amyloid protein precursor mRNA in human brain: their differential expression in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 157:472-479.
- Tandon A, Rogaeva E, Mullan M, St George-Hyslop PH. 2000. Molecular genetics of Alzheimer's disease: the role of beta-amyloid and the presenilins. *Curr Opin Neurol.* 13:377-384.
- Tanemura K, Akagi T, Murayama M, Kikuchi N, Murayama O, Hashikawa T, et al. 2001. Formation of filamentous tau aggregations in transgenic mice expressing V337M human tau. *Neurobiol Dis.* 8:1036-45.
- Tanzi RE, et al. 1988. Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature.* 331:528-530.
- Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GA, St George-Hyslop P, Van Keuren ML, et al. 1987. Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science.* 235:880-884.

- Tatebayashi Y, Miyasaka T, Chui DH, Akagi T, Mishima K, Iwasaki K, et al. 2002. Tau filament formation and associative memory deficit in aged mice ex-pressing mutant (R406W) human tau. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:13896-901.
- Tekirian TL, et al. 1998. N-terminal heterogeneity of parenchymal and cerebrovascular A $\beta$  deposits. *J. of Neuropathology and Experimental Neurology*. 57:76-94.
- Theuns J, Van Broeckhoven C. 2000. Transcriptional regulation of Alzheimer's disease genes: implications for susceptibility. *Hum Mol Genet*. 9:2383-2394.
- Tomiyama T, Corder EH, Mori H. 1999. Molecular pathogenesis of apolipoprotein E-mediated amyloidosis in late- onset Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci*. 56:268-279.
- Townsend M, et al. 2006. Effects of secreted oligomers of amyloid  $\beta$ -protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. *J. Physiol*.
- Townsend M, Shankar GM, Mehta T, Walsh DM, Selkoe DJ. 2006. Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein in hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. *J. Physiol*. 572 (Pt2), 477-492.
- van der Linden, et al. 1999. Comparison of physical-chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim. Biophys. Acta*. 1431:37-46.
- van Duijn CM, Cruts M, Theuns J, Van Gassen G, Backhovens H, van den Broeck M, et al. 1999. Genetics association of the presenilina-1 regulatory region with early-onset Alzheimer's disease in a population-based sample. *Eur J Hum Genet*. 7:801-806.
- Van Nostrand WE, et al. 1989. Protease nexin-II, a potent antichymotrypsin, shows identity to amyloid  $\beta$ -protein precursor. *Nature*. 341:546-549.
- Victor M y Ropper AH. 2002. Principios de neurología Adams y Victor. 7<sup>a</sup>. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana, México.
- Visintin M, et al. 2002. The intracellular antibody capture technology (IACT) : towards a consensus sequence for intracellular antibodies. *J. Mol. Biol*. 317, 73-83.
- Walsh DM, et al. 1997. Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J. Biol. Chem*. 272:22364-22372.
- Walsh DM, et al. 1999. Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J. Biol. Chem*. 274:25945-52.
- Walsh DM, et al. 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid  $\beta$  protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature*. 416:535-39.
- Walsh DM, Selkoe DJ. 2007. A $\beta$  oligomers – a decade of discovery. *J. Neurochem*. 101, 1172-1184.
- Wang HW, et al. 2002. Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Res*. 924:133-40.
- Ward RV, et al. 2000. Fractionation and characterization of oligomeric, protofibrillar and fibrillar forms of beta-amyloid peptide. *Biochem. J*. 348:137-44.
- Ward, et al. 1989. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli. *Nature*. 341:544-46.
- Weidemann A, et al. 2000. Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell*. 57:115-126.
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. 1975. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA*. 72:1858-1862.
- Weisgraber KH. 1994. Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv Protein Chem*. 45:249-302.
- Whitehouse PJ, Price DL, Clark AW, Coyle JT, DeLong MR. 1981. Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann Neurol*. 10:122-6.
- Whitson JS, et al. 1989. Amyloid  $\beta$ -protein enhances the survival of hippocampal neurons in vitro. *Science*. 243:1488-90.
- Wilcock DM, Colton CA. 2008. Anti-amyloid beta immunotherapy in Alzheimer's disease: relevance of transgenic mouse studies to clinical trials. *J. Alzheimer's Dis*. 15, 555-569.
- Wilcock DM, et al. 2003. Intracranially administered mechanisms both independent of and associated with microglial activation. *J. Neurosci*. 23:3745-3751.
- Wilcock DM, et al. 2006. Deglycosylated anti-amyloid- $\beta$  antibodies eliminate cognitive deficits and reduce parenchymal amyloid with minimal vascular consequences in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *J. Neurosci*. 26, 5340-5346.

- Wyss-Coray T, Yan F, Lin AH, Lambris JD, Alexander JJ, Quigg RJ, et al. 2002. Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement- inhibited Alzheimer's mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:10837-42.
- Xia W, et al. 1997. Interaction between amyloid precursor protein and presenilins in mammalian cells: implications for the pathogenesis of Alzheimer disease. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*. 94:8208-8213.
- Xu PT, Gilbert JR, Qiu HL, Rothrock-Christian T, Settles DL, Roses AD, *et al.* 1998. Regionally specific neuronal expression of human APOE gene in transgenic mice. *Neurosci Lett*. 246:65-68.
- Yan SD, et al. 1996. RAGE and amyloid- $\beta$  peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*. 382:685-91.
- Yankner BA, et al. 1990. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid  $\beta$  protein. Reversal by tachykinin neuropeptides. *Science*. 250:279-81.
- Yankner BA, Lu T. 2009. Amyloid beta-protein toxicity and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biol Chem*. 284:4755-9. Epub 2008.
- Yu G, et al. 2000. Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature*. 407:48-54.
- Zhang B, Higuchi M, Yoshiyama Y, Ishihara T, Forman MS, Martinez D, et al. 2004. Retarded axonal transport of R406W mutant tau in transgenic mice with a neurodegenerative tauopathy. *J Neurosci*. 24:4657-67.