

La Enfermedad de Alzheimer, Estrategias Terapéuticas

Marcia G. García, Karen Manoutcharian

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. México D.F. 04510. E-mail: karman@servidor.unam.mx

Palabras clave: Enfermedad de Alzheimer, despliegue en fagos, péptido beta-amiloide

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) representa un gran problema de salud pública que se acrecienta a medida que la población mundial envejece, motivo por el cual es importante el atacar a este problema para poder mejorar la calidad de vida de las personas que lo sufren,

Se ha hipotetizado que la acumulación del péptido beta-amiloide (β A) en el cerebro juega un papel muy importante en la neuropatología de la enfermedad de Alzheimer por lo que la remoción y desagregación del péptido es una opción terapéutica que está siendo explorada actualmente ya que se han encontrado resultados alentadores en este campo.

Los anticuerpos anti- β A se encuentran dentro de los compuestos capaces de destruir los oligómeros, protofibrillas y fibrillas de β A, así como prevenir su agregación. Estudios *in vivo* han demostrado que los anticuerpos anti- β A tienen la capacidad de eliminar los depósitos preexistentes de β A y/o prevenir el desarrollo de nuevos agregados junto con el mejoramiento de las funciones cognitivas. Sin embargo, los efectos adversos observados con la administración de anticuerpos completos ha llevado a los investigadores a buscar otras opciones, como el uso de los fragmentos de anticuerpos.

La tecnología de “despliegue en fagos” permite la expresión de fragmentos de anticuerpos sobre la superficie de fagos filamentosos, proporcionando un método mucho más práctico y rápido para la obtención de anticuerpos monoclonales.

En nuestro grupo de trabajo, se seleccionó un anticuerpo recombinante (clona b4.4) dirigido contra el péptido β A₁₋₄₂, a partir de una biblioteca humana no inmune de fragmentos de anticuerpos (scFv; cadena sencilla del fragmento variable) creada por el método de despliegue en fagos. También se demostró la capacidad de este fragmento de anticuerpo para inhibir el efecto citotóxico del péptido β A₁₋₄₂ en ensayos *in vitro* utilizando la línea celular SH-SY5Y.

Keywords: Alzheimer's disease, phage display, amyloid beta peptide

ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD) represents a serious public health problem that increases as the world population grows older, therefore it is very important to attack this problem in order to provide a better life quality for the persons suffering from it.

It's been hypothesized that the accumulation of amyloid beta peptide ($a\beta$) on the brain plays a very important role in the neuropathology of this disease, suggesting the remotion and disaggregation of the peptide as a viable therapeutic option that is being explored nowadays due to the good results found on this field.

Anti- $a\beta$ antibodies are among the compounds capable of destroying the oligomers, protofibrils and fibrils of $a\beta$, preventing their aggregation as well. *In vivo* studies have demonstrated that anti- $a\beta$ antibodies are able to eliminate the preexistent deposits of $a\beta$ and/or prevent the development of new aggregates along with cognitive function improvement. However, the adverse effects observed when complete antibodies were

administered lead the scientists to search for other options such as the use of antibody fragments.

Phage display technology allows the expression of antibody fragments over the surface of filamentous phages, providing a faster and practical method for obtaining monoclonal antibodies.

Our group selected a recombinant antibody (clone b4.4) directed against A β ₁₋₄₂, peptide, from a human native antibody fragment (scFv; single chain fragment variable) library created by phage display. We demonstrated that this antibody fragment has the ability to inhibit A β ₁₋₄₂, peptide's cytotoxicity on *in vitro* assays using the SH-SY5Y cell line.

INTRODUCCIÓN

La neuropatología característica de la enfermedad de Alzheimer (EA) fue descrita por primera vez en 1907 por el Dr. Alois Alzheimer.

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

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la incidencia de esta enfermedad es de aproximadamente 20 millones de pacientes en todo el mundo, cifra que en menos de 10 años podría triplicarse si se considera la rapidez con la que aumenta la población mayor (OMS., 2006 www.who.int).

Los países en vías de desarrollo como China, India y la mayor parte de Latinoamérica conforman actualmente más del 50% de las personas con la enfermedad de Alzheimer y se estima que para el 2025 aumentará la tasa de crecimiento de enfermos de Alzheimer concentrándose en estos países

aproximadamente el 70% de los afectados de todo el mundo. Se sabe que el 5% de los hombres y el 6% de las mujeres que han cumplido los 60 años presentan la enfermedad, mientras que el 25-50% de las personas a partir de los 85 años tienen un cuadro sintomático de Alzheimer, además de que un número mayor presenta alguno de los patrones patológicos sin manifestación de síntomas (OMS, 2006). Los problemas individuales y el enorme costo para la sociedad han incrementado la preocupación por esta enfermedad (Fassbender *et al.*, 2001).

La EA tiene como consecuencia la pérdida irreversible de neuronas, particularmente en la corteza, el hipocampo, el sistema límbico y los ganglios basales. Se manifiesta inicialmente por afectar levemente las funciones cognitivas como pérdida de la memoria episódica de corto plazo y la orientación en tiempo y espacio. Posteriormente se presenta una pérdida creciente y progresiva de la memoria, de juicio, de toma de decisiones, de orientación espacial y de lenguaje. Después de una década o más se manifiesta una demencia marcada, desorientación e inmovilidad total hasta la muerte por fallo cardiorrespiratorio, siendo considerada una causa frecuente de muerte en personas adultas de entre 55 a 65 años (Larson *et al.*, 2004). Sus características patológicas son la pérdida neuronal, la presencia de placas seniles extracelulares conformadas por el péptido beta-amiloide (también llamadas placas neuríticas), conglomerados neurofibrilares y anomalías neuroquímicas (Nussbaum *et al.*, 2003; Dugué *et al.*, 2003; Shastri, 2003). Se denomina β A a aquellas proteínas con estructura secundaria de láminas β que se tiñen con rojo congo o con tioflavina S (Klein *et al.*, 2001).

Las placas neuríticas son lesiones multicelulares esféricas que contienen depósitos extracelulares de péptido β A en su mayor parte en forma fibrilar. Están rodeadas de axones degenerados y dendritas distróficas, células de microglía activadas y astrositos reactivos (Maimone *et al.*, 2001). La

densidad amiloide del centro de cada placa se ha relacionado con el estadio de formación de la placa, desde las recién formadas con un centro muy difuso, hasta las placas terminales con un centro denso (Vickers *et al.*, 2000).

El péptido β A de las placas neuríticas es un producto del metabolismo normal de una glicoproteína transmembranal llamada proteína precursora del amiloide (APP). Existen dos vías principales para el procesamiento de la APP: Por actividad de una α secretasa se libera el ectodominio sAPP α N-terminal y se produce un fragmento C-terminal de 83 residuos de aminoácidos (C83) que es transmembranal. Posteriormente una actividad γ secretasa produce el fragmento P3 que es una forma N-terminal truncada del péptido β A. Por otro lado, la actividad de β secretasa libera el ectodominio sAPP β N-terminal produciendo un fragmento C-terminal transmembranal de 99 residuos de aminoácidos (C99). La actividad γ secretasa produce el péptido β A de diferentes tamaños: de 39 a 43 aminoácidos (Wolfe, 2002; Irizarry, 2001).

Recientemente se ha postulado que el procesamiento anormal de la APP debido a mutaciones en su secuencia, conducen a la EA en algunas familias (Winblad, 2003; Wolfe, 2002; Hardy *et al.*, 2002). Los datos obtenidos del estudio de mutaciones poco frecuentes en familias con desarrollo temprano de la EA se ha utilizado para identificar blancos terapéuticos y para crear modelos animales (Nussbaum *et al.*, 2003).

A la fecha hay evidencias importantes que indican que la variabilidad genética en el catabolismo del péptido β A y su remoción pueden contribuir al riesgo de desarrollo temprano de la EA (Irizarry, 2001). Sin embargo, cada vez más reportes sugieren que la acumulación masiva del péptido beta-amiloide de 42 aminoácidos (β A42) en fibrillas, es un evento primario en la patogénesis de la EA (Ardí *et al.*, 2002).

Desde el punto de vista genético, la EA es dicotómica, puede ser de desarrollo temprano

cuando hay mutaciones persistentes que se transmiten de manera autosomal, o puede ser de desarrollo tardío debido a polimorfismos comunes (Tanzi *et al.*, 2001).

Se ha postulado que las placas neuríticas presentan neurotoxicidad que conduce a la muerte celular y en algunos estudios se han correlacionado la densidad de las placas, y no el número de ellas, con las características clínicas de la EA (Dugué *et al.*, 2003; Ardí *et al.*, 2002), sin embargo, no se ha encontrado correlación. Se ha propuesto que el incremento de especies de oxígeno reactivo y algunos metales como el hierro o el aluminio contribuyen a la degeneración neuronal (Shastri, 2003). Adicionalmente, se han identificado algunos derivados del nitrógeno, enzimas proteolíticas y citocinas inflamatorias en los procesos de neurodegeneración en la EA (Fassbender *et al.*, 2001; Vickers *et al.*, 2000).

Debido a que el péptido β A esta asociado a la EA, las proteasas que lo generan son de gran interés para el desarrollo de compuestos con potencial terapéutico (Ardí *et al.*, 2002). La β secretasa ha sido clonada y se han desarrollado inhibidores para ella (Ardí *et al.*, 2002; Dugué *et al.*, 2003; Shastri, 2003). Así mismo, recientemente se ha logrado identificar la γ secretasa y se han desarrollado tanto inhibidores como moduladores de su actividad (Wolfe, 2002; Citron, 2002). Sin embargo, estos inhibidores secundarios pueden tener efectos sobre la función normal de las proteasas mencionadas.

Teniendo en cuenta esta desventaja, resultan de interés otros compuestos que puedan desagregar los depósitos amiloides y/o prevenir la formación de oligómeros y fibrillas de péptido β A (Irizarry *et al.*, 2001).

Se ha encontrado que las fibrillas de péptido β A no son las únicas formas neurotóxicas, sino que también se ensamblan en formas solubles (protofibrillas), formando estructuras curvilíneas de 4-11 nm en diámetro y menos de 200 nm de longitud. Las protofibrillas causan estrés oxidativo *in*

vitro, al desacoplar los transportadores iónicos y de glucosa en la membrana celular, lo cual genera desestabilización de la homeostasis celular del calcio. También causan cambios electrofisiológicos lo que eventualmente conduce a la muerte neuronal. Además de las protofibrillas, algunos oligómeros pequeños llamados ligandos difusibles de βA (ADDL), son neurotóxicos *in vitro*. Ambas formas escapan a la detección con anticuerpos dirigidos a las fibrillas del péptido βA (Klein *et al.*, 2001).

El depósito de formas insolubles del péptido βA en estructuras similares a placas da como resultado daño estructural en los axones. Las neuronas responden con cambios locales en el sitio del daño con mecanismos de adaptación o regeneración pero en la EA estos resultan ineficientes debido al fuerte estrés mecánico generado por las placas más compactas del péptido βA (Vickers *et al.*, 2000).

Es claro que el depósito de péptido βA en el cerebro es un evento relacionado con la edad y existe evidencia que indica que la formación de placas en cierto grado, es inevitable con la edad. (Maimone *et al.*, 2001).

Los oligómeros del péptido βA soluble representan micelas de proteínas porque el péptido βA es anfipático y reactivo en su superficie, la formación de oligómeros es dependiente de una concentración crítica y su formación se correlaciona con la aparición de un ambiente hidrofóbico. Se ha observado que los oligómeros solubles son neurotóxicos y se han encontrado en el cerebro de pacientes con la EA. Se ha sugerido que estos oligómeros no se acumulan con el tiempo pero pueden servir como núcleos para desarrollar estructuras fibrilares (Kayad *et al.*, 2003).

En un paciente típico con EA hay una población mixta de oligómeros de péptido βA y placas neuríticas maduras. Estos oligómeros pueden permanecer como moléculas solubles e interactuar destructivamente con las neuronas. Se han hecho estudios estructurales para identificar los

mecanismos por los que estos oligómeros son importantes en la patogénesis de la EA con miras a desarrollar estrategias inhibitoras (Jackson *et al.*, 2000).

Las dos formas predominantes del péptido βA en la enfermedad de Alzheimer son el fragmento $\beta A40$, el más abundante en circulación y con mayor solubilidad, así como el fragmento $\beta A42$, menos soluble y considerado el más tóxico y que se encuentra en mayor cantidad en las placas seniles. Se ha observado que las suspensiones del péptido $\beta A42$ son igualmente tóxicas a las del péptido $\beta A40$. Sin embargo, el péptido $\beta A42$ presenta una cinética de agregación extremadamente rápida respecto del péptido $\beta A40$. (El-Agnaf *et al.*, 2000).

Existe evidencia que apoya que no es el depósito de péptido βA lo que desencadena la EA, si no más bien la agregación del péptido. Aunado a esto, se han encontrado factores especie-específicos y relacionados a la edad, que modulan la toxicidad del péptido βA .

Los estudios en modelos transgénicos de la EA y en muestras de pacientes, han demostrado que los depósitos de péptido βA más grandes y densos están asociados a la pérdida neuronal y que no existe una penumbra de toxicidad sino que se comportan como lesiones tóxicas focalizadas. Se ha comprobado que los depósitos de péptido βA tienen una conformación de lámina β -plegada relevante para la toxicidad *in vivo*, por lo que la prevención o remoción de depósitos de péptidos son estrategias terapéuticas potenciales (Urbanc *et al.*, 2002).

La relación entre la neurotoxicidad del péptido βA y la APP no es clara, pero es posible que la APP pueda modular la toxicidad del péptido βA . La formación de fibrillas del péptido βA convierte al mismo péptido βA en una forma con alta afinidad por proteínas de membrana de las neuronas y particularmente por la APP. En contraste, los agregados amorfos de péptido βA no muestran unión a proteínas de membrana, este resultado

correlaciona bien con la ausencia de toxicidad. Existen varios mecanismos por los que APP promueve la muerte celular, pero los resultados experimentales sugieren que la unión de APP y β A aumenta la toxicidad por cambios conformacionales que disparan la muerte celular (Lorenzo *et al.*, 2000).

ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS

Considerando la hipótesis de la cascada amiloide, se han desarrollado estrategias mediante inmunoterapia que incluyen la inhibición de secretasas, neuroprotección por reducción de la producción del péptido β A, la búsqueda de compuestos que puedan potenciar la inhibición de la agregación del péptido β A y/o promoción de su remoción. Algunos de estos compuestos son anticuerpos anti- β A que se pueden unir a las placas seniles y desagregarlas (Solomon *et al.*, 1997).

Se ha demostrado que estos anticuerpos anti- β A pueden desagregar las placas y también revertir el daño neuronal, por un mecanismo aún no descrito (Lombardo, 2003); la administración periférica de anticuerpos anti- β A monoclonales reducen la formación de placas en cerebros de ratones PDAPP y restauran la memoria y la capacidad de aprendizaje (Bard *et al.*, 2000), todo esto ha demostrado que la inmunización pasiva puede interferir con los procesos de desagregación de las placas seniles. Por otra parte, se ha observado que la presencia de fragmentos Fc de los anticuerpos, puede desencadenar una respuesta inmune innata en el cerebro, provocando inflamación crónica, pérdida neuronal y elevada secreción del péptido β A, afectando el balance entre la agregación y desagregación de las placas (Broytman *et al.*, 2004).

Como parte de la prueba multicéntrica para la vacuna AN1792 en pacientes con EA en grado medio o moderado, en treinta pacientes se probó una inmunización activa con péptido sintético β A₁₋₄₂ pre-agregado, mediante una inyección intramuscular y un refuerzo a las cuatro semanas.

Se obtuvo suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) y se encontró que los anticuerpos anti- β A generados en respuesta a la vacunación, no tienen reacción cruzada con el ectodominio de la proteína APP en la superficie celular y son específicos a depósitos de péptido β A (Hock *et al.*, 2002). Los anticuerpos también fueron encontrados en LCR, lo que demuestra su capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica. Por otro lado, se encontró la estabilización cognitiva relevante en la vida diaria de los pacientes que presentaron anticuerpos contra placas de péptido β A (Hock *et al.*, 2003). Estos datos sugieren que los anticuerpos contra placas de péptido β A pueden detener o retardar el deterioro clínico y cognitivo en pacientes con la EA.

Sin embargo, en enero de 2002 fue suspendida la prueba clínica con AN-1792 debido a que algunos pacientes presentaban inflamación en el sistema nervioso central. El fármaco probado (Betabloc), contenía una versión sintética del péptido β A y causaba que el sistema inmune atacara las placas neuríticas. Sin embargo, se sugirió una posible respuesta autoinmune porque la APP se encuentra en muchas células normales incluyendo las neuronas (Washington, 2000).

En la prueba clínica con AN-1792, posiblemente los anticuerpos se unieron a las placas neuríticas y se dio una condición de inflamación crónica como una respuesta aguda para acelerar la remoción del péptido β A en el cerebro. En pacientes de edad avanzada, la vacunación tiene el potencial de exacerbar la neuroinflamación, a través de la invasión al cerebro de células T-citotóxicas que acelerarían la pérdida neuronal y la demencia.

Debido a esto, se ha intentado optimizar un protocolo de inmunización utilizando únicamente los fragmentos de inmunoglobulinas que interactúen específicamente con el péptido β A como los fragmentos F(ab')₂ que fueron tan efectivos como la administración del anticuerpo completo (Bacsikai *et al.*, 2002). Estos anticuerpos, reconocen la región amino terminal del péptido β A (EFRH), pero se ha demostrado que cuando son dirigidos al extremo

amino terminal del péptido β A se asocian a hemorragias cerebrales en ratones transgénicos APP23 (Pfeifer *et al.*, 2002).

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

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

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

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

el tratamiento en animales envejecidos también reduce la extensión y progresión de las neuropatías que se presentan en la EA, que se presentarían sin tratamiento. Se hizo patente que la inmunización con péptido β A42 genera anticuerpos específicos anti- β A (Schenk *et al.*, 1999).

Ya que la utilización de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el péptido β A, ha sido útil en el tratamiento de los signos y síntomas en modelos animales *in vitro*, es fácil plantearse el uso de fagos filamentosos que presentan fusiones de polipéptidos a sus proteínas de superficie como método de producción de moléculas que se unan al β A, tomando en cuenta las ventajas que confiere esta tecnología en la producción de monoclonales.

También se ha demostrado que el empleo de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv), puede desagregar las placas seniles (Frenkel *et al.*, 2000). Considerando esta premisa, se han desarrollado bibliotecas de scFv tanto inmunes (de ratón), como no inmunes (de humano) a partir de las cuales ha sido posible encontrar anticuerpos dirigidos a diferentes regiones del péptido β A (Manoutcharian *et al.*, 2003; Manoutcharian *et al.*, 2004).

Se ha discutido ampliamente sobre si la inmunización pasiva es suficiente para que los anticuerpos anti-péptido β A, atraviesen la barrera hematoencefálica y entren al sistema nervioso central (SNC). Un grupo de investigación, no logró detectar anticuerpos en las placas seniles (Bard *et al.*, 2000) pero otro grupo si lo hizo (Morgan *et al.*, 2000). La única diferencia entre ambos es la vía de administración del anticuerpo, intravenosa en el primer caso, e intraperitoneal en el segundo. Resulta posible que la forma de administración podría influir en la capacidad de los anticuerpos de atravesar la barrera hematoencefálica. Sin embargo, también es concebible que los anticuerpos actúen como "precipitantes periféricos de péptido β A" por lo que aun se requiere de más estudios del tema para vislumbrar la manera en que actúa la inmunoterapia anti-péptido β A (Lee, 2001).

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

El despliegue en fagos es una tecnología que permite la expresión de uno, o un conjunto de péptidos o proteínas fusionados a una de las proteínas de la cubierta del bacteriófago, resultando en un desplegado de la fusión proteica sobre la superficie del virión (McCafferty *et al.*, 1990). Al mismo tiempo, el ADN que codifica tal fusión se encuentra dentro del virión que lo expresa (Whitlow *et al.*, 1991).

El despliegue en fagos ha sido usado para crear una unión física entre una vasta biblioteca de secuencias peptídicas aleatorias y ADN's que codifican para dichos péptidos, permitiendo una rápida identificación de ligandos peptídicos para una variedad de moléculas blanco (anticuerpos, enzimas, receptores celulares, etc.), por un proceso de selección *in vitro* llamado bioselección (biopanning).

Se han usado bibliotecas peptídicas aleatorias desplegadas sobre los fagos en un gran número de aplicaciones, como el mapeo de epítomos, el mapeo de interacciones proteína-proteína, la identificación de ligandos no peptídicos, péptidos activos y sustratos de proteasas, entre otras (Batra *et al.*, 1990).

Los anticuerpos desplegados son inmunoterapéuticos muy confiables, fáciles de producir, bien tolerados y de buen comportamiento clínico. Mediante el rearrreglo de los dominios variables y bioselección de anticuerpos de ratón, se puede generar una versión humana con características similares de afinidad, o bien se puede aplicar el proceso de humanización (Hoogenboom *et al.*, 2000).

La fuente de los dominios de los genes variables y los tipos de CDR's incluidos determinarán la especificidad y frecuencia de clonas específicas a un antígeno de interés, como la calidad (afinidad y frecuencia de mutaciones de nucleótidos) de las clonas seleccionadas. Los anticuerpos altamente afines a un antígeno se pueden seleccionar más fácilmente a partir de bibliotecas inmunes, mientras que las bibliotecas sintéticas y no inmunes son útiles como fuentes de anticuerpos a muchos diferentes antígenos. El formato de expresión también influye en los resultados de la selección, por lo que se prefiere utilizar la fusión a cplII en fagémidos, porque permite una alta frecuencia de expresión monovalente y la fácil conversión de anticuerpos expresados en fagos a anticuerpos solubles secretados (Hoogenboom *et al.*, 2000).

Los sistemas de fagémidos permiten la expresión de polipéptidos que no pueden ser expresados en sistemas de expresión simple, debido a que los efectos deletéreos de las proteínas de fusión son atenuados por la presencia de proteínas de envoltura del fago ayudador de tipo silvestre. Por eso, actualmente se ha logrado la expresión funcional de polipéptidos en las cinco proteínas de envoltura del fago mediante sistemas fagémidos. A la fecha existen reportes que demuestran que la envoltura del fago es extremadamente tolerante a la adición de nuevas proteínas y estas proteínas pueden ser específicamente modificadas para mejorar el despliegue en los fagos.

Existen bibliotecas de péptidos expresadas en fagos que pueden ser usadas para aislar péptidos

que se unen con alta especificidad y afinidad a prácticamente cualquier proteína de interés. Estos péptidos pueden ser utilizados como reactivos para entender el reconocimiento molecular, o como moléculas para el diseño de fármacos. En este contexto se ha demostrado que muchos péptidos identificados mediante bibliotecas en fagos, se unen a estructuras tridimensionales biológicamente relevantes por lo que han sido utilizados para identificar nuevos sitios para el diseño de inhibidores enzimáticos.

Una de las ventajas de usar M13 como sistema, es que se puede obtener el ADN en dos formas, dependiendo de lo que se necesite. Puede obtenerse ADN de una sola cadena para secuenciar a partir de los fagos, o bien ADN de doble cadena tipo plásmido a partir de las células infectadas (Messing, 1991). Recientemente se ha desarrollado un sistema de vector llamado fagémido, el cual combina las ventajas de los vectores plasmídicos y de fago. El fagémido posee los orígenes de replicación de M13 (de cadena sencilla) y del plásmido (de doble cadena).

Los fagémidos pueden cultivarse como plásmidos o como fagos recombinantes con la ayuda de un fago *helper* como M13KO7, ya que a pesar de que el fagémido tiene el origen de replicación de M13, le hacen falta los genes de las proteínas del fago que se requieren para poder producir una partícula viral completa. Por lo tanto, las células transformadas con el fagémido deben ser infectadas con un fago *helper* que codifique para las proteínas necesarias para replicar y empaquetar el ADN de cadena sencilla del fagémido, en partículas de M13 (rescate de fago). La presencia de un marcador de resistencia como la ampicilina en el fagémido, hace posible la selección de las células transformadas en un medio que contiene antibiótico.

McCafferty *et al.* (1990) mostraron que los fragmentos de anticuerpo podían ser expresados en la superficie de partículas de fago mediante la fusión de los genes variables de los anticuerpos a

una de las proteínas del fago. Los anticuerpos expresados en fagos que son específicos para un antígeno de interés, pueden ser enriquecidos posteriormente por múltiples rondas de selección por afinidad (al antígeno), debido a que la partícula del fago lleva el gen que codifica para el anticuerpo expresado. Esto se reportó por primera vez por McCafferty *et al.* (1990), para fragmentos de anticuerpos scFv. Esta aplicación consiste en expresar fragmentos de anticuerpos scFv como proteínas de fusión desplegadas en la superficie de fagos filamentosos, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la cual los genes de las regiones variables (V) de las inmunoglobulinas se amplifican a partir de hibridomas o de células de bazo. Los genes de la fracción variable pesada (VH) y de la ligera (VL) se clonan en un vector de fago y se expresan fusionados a una proteína de superficie del fago.

Cada genoma de fago recombinante contiene los genes V que determinan la secuencia de aminoácidos de los CDR del anticuerpo que se expresará en su superficie. Dado que la región del anticuerpo desplegado mantiene su capacidad de unión al antígeno, es posible enriquecer los fagos recombinantes que expresen anticuerpos específicos por medio de selección por afinidad. De esta manera, los anticuerpos de una afinidad y especificidad determinada pueden seleccionarse a partir de una población.

La tecnología de expresión de scFv's en fagos recombinantes tiene el poder y la versatilidad de mimetizar las características de la diversidad y selección inmune *in vivo*. Se prevé que en un futuro podrán sustituirse las prácticas de inmunizar animales y el desarrollo de hibridomas, por un sistema bacteriano capaz de sintetizar y expresar cantidades de anticuerpos virtualmente ilimitadas para prácticamente cualquier antígeno.

Casi todas las proteínas scFv contienen un *linker* de 15 aminoácidos (Gly4Ser)₃. Este péptido *linker* flexible se diseña 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. La afinidad y estabilidad de los anticuerpos scFv que contienen los residuos (Gly4Ser)₃ son generalmente comparables con los de un anticuerpo nativo.

Cuando los anticuerpos recombinantes se unen al antígeno, unen eficazmente al fago también. La presencia de fago unido a antígeno es por lo tanto un indicador indirecto de que los anticuerpos reactivos al antígeno se expresan en la punta. Este fago por si mismo puede ser detectado con un anticuerpo marcado contra la proteína de superficie cpVIII. Ya que esta proteína de cobertura se presenta en varios miles de copias en la superficie del fago, ésta amplifica eficazmente la señal.

En nuestro grupo de trabajo, se seleccionó un anticuerpo recombinante (clona b4.4) dirigido contra el péptido βA_{1-42} , a partir de una biblioteca humana no inmune de fragmentos de anticuerpos (scFv; cadena sencilla del fragmento variable), creada por el método de despliegue en fagos. También se demostró la capacidad de este fragmento de anticuerpo para inhibir el efecto citotóxico del péptido βA_{1-42} en ensayos *in vitro*, utilizando la línea celular SH-SY5Y. Dicha clona (b4.4), expresa el fragmento de anticuerpo en fusión a la proteína cpIII del fago filamentoso M13 (de 3 a 5 copias en el fago). Con el antecedente de los resultados neuroprotectores que presenta la clona, se llevó a cabo una subclonación para expresar el fragmento recombinante en un alto número de copias, la clona construida respondió de manera favorable, potenciando el reconocimiento hacia el péptido βA_{1-42} y demostrando también una capacidad neuroprotectora, siendo este un resultado bastante alentador, ya que se obtuvo una molécula que a largo plazo puede constituir una opción terapéutica barata y de rápida obtención, dadas las ventajas que el despliegue en fagos proporciona.

REFERENCIAS

- Backsai F, Kajdasz S, McLellan M, Games D, Seubert P, Schenk D & Hyman B (2002) Non Fc-mediated mechanisms are involved in clearance of A β in vivo by immunotherapy. *J. Neurosci.* 22: 7873-7878.
- Bard F, Barbour R, Cannon C, Carretto R, Fox M, Games D, Grajeda H, Guido T, Hoenow K, Hu K, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee C, Lee M, Motter R, Nguyen M, Vasquez N, Seubert P, Yednock T, Selkoe D, Burke R, Grajeda H, Huang J, Lieberburg I, Soriano F, Weiss K, Welch B, Mutter L & Yednock T (2000) Peripherally administered antibodies against A β peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat. Med.* 6: 916-919.
- Batra JK, FitzGerald D, Gately M, Chaudhary VK & Pastan I (1990) Anti-Tac(Fv)-PE40, a single chain antibody Pseudomonas fusion protein directed at interleukin 2 receptor bearing cells. *J Biol Chem.* 265: 15198-15202.
- Broytman Oleg & Malter James S (2004) Anti -A β : The good, the bad and the unforeseen; *J. Neurosc. Res.* 75: 301-306.
- Citron M (2004) Strategies for disease modification in alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 5: 667-685.
- Citron M (2002) Alzheimer's disease: treatments in discovery and development. *Nat. Neurosci.* 5; 1055-1057.
- Dugué M, Neugroschl J, Sewell M & Martin D (2003) Review of dementia. *Mt. Sinai J. Med.* 70: 45-53.
- El-Agnaf O, Guthrie D, Walsh D, Irvine B (1998) The influence central containing residues 19-25 on the aggregation properties and secondary structure of Alzheimer's β -amyloid peptide. *Eur. J. Biochem.* 256: 560-569.
- Fassbender, K, Masters C & Beyreuther K (2001) Alzheimer's disease: molecular concepts and therapeutic targets. *Naturewissenschaften* 88: 261-67.

- 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.
- Gaskin F, Finley J, Fang Q, Xu S & Man S (1993) Human antibodies reactive with β -amyloid protein in Alzheimers disease. *J. Exp. Med.* 177: 1181-1186.
- Hardy J & Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297: 353-358.
- Hock C, Konietzko W, Schtreffer J, Tracy J, Garcia E, Wollmer A, Hoffman M, Maddalena A & Papassotiropoulos A (2003) Antibodies against β -amyloid slow cognitive decline in Alzheimers disease. *Neuron* 38: 547-554.
- Hoogenboom H & Chames P (2000) Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunol. today* 21: 371-378
- Irizarry M & Hyman B (2001) Alzheimer disease therapeutics. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 60: 923-928.
- Jackson T, Yang D & Plaskos N, (2000) Structural studies of soluble oligómers of the Alzheimer β -amyloid peptide. *J. Mol. Biol.* 297: 73-87.
- Kayed R, Head E, Thompson J & Glabe C (2003) Common structure of soluble amyloid oligómeros implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300: 486-489.
- Klein W, Kraft G & Finch C (2001) Targeting small Ab oligómeros: the solution to an Alzheimers disease condundrum? *Trends Neurosci.* 24: 219-224.
- Larson EB, Shadlen MF, Wang L, McCormick WC, Bowen JD, Teri L & Kukull WA (2004) Survival after initial diagnosis of Alzheimer disease. *Ann. Intern. Med.* 140: 501-509.
- Lee VM (2001) Abeta immunization: moving a beta-peptide from brain to blood. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 8931-8932.
- Lombardo JA, Stern EA, Stephen KT, Hickey GA, Bacsikai BJ & Hyman BT (2003) Amyloid- β -antibody treatment leads to rapid normalization of plaque-induced neuritic alteration *J. Neurosci.* 23: 10879-10883.
- Lorenzo A, Yuan M, Zhang Z & Mautino J (2000) Amyloid β interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimers disease. *Nat. Neurosci.* 5: 460-464.
- Maimone D, Dominici R & Grimaldi L (2001) Pharmacogenomics of neurodegenerative diseases. *Eur. J. of Pharmaco.* 413: 11-29.
- Manoutcharian K, Acero G, Munguia ME, Becerril B, Massieu L, Govezensky T, Ortiz E, Marks JD, Cao C, Ugen K & Gevorkian G (2004) Human single chain Fv antibodies and a complementarity determining region-derived peptide binding to amyloid-beta 1-42. *Neurobiol. Dis.* 17: 114-121.
- Manoutcharian K, Acero G, Munguia ME, Montero JA, Govezensky T, Cao C, Ugen K & Gevorkian G (2003) Amyloid-beta peptide-specific single chain Fv antibodies isolated from an immune phage display library. *J. Neuroimmunol.* 145: 12-17.
- McCafferty J, Griffiths AD, Winter G & Chiswell DJ. (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348: 552-554.
- Messing J (1991) Cloning in M13 phage or how to use biology at its best. *Gene*, 100: 3-12.
- Morgan D, Diamond D, Gottschall P, Ugen K, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, Di carlo G, Gordon M & Arendash G (2000) Ab peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimers disease *Nature*, 408: 982-985.
- Nussbaum R & Ellis C (2003) Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N. Eng. J. Med.* 348: 1356-1364.
- Pfeifer M, Boncristiano S, Bondolfi L, Stalde A, Deller T, Staufenbiel M, Mathews P & Jucker M (2002) Cerebral hemorrhage after passive anti-Ab immunotherapy. *Science*, 298: 1379.

- Schenk D, Barbour R, Duna W, Gordon G, Grajeda H, Mutter L & Shopp G (1999) Immunization with amyloid β attenuates Alzheimer disease like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*, 400: 173-177.
- Solomon B, Koppel R, Frankel D & Hanan-Aharon E (1997) Disaggregation of Alzheimer β -amyloid by site-directed mAb. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 4: 4109-4112.
- Shastri B (2003) Neurodegenerative disorders of protein aggregation. *Neurochem. Int.* 43: 1-7.
- Tanzi R & Bertram L (2001) New frontiers in Alzheimer's disease genetics. *Neuron*, 32: 181-184.
- Urbanc B, Cruz L, Le R, Sanders J, Stanley E & Irizarry M (2002) Neurotoxic effects of thioflavin S-positive amyloid b deposits in transgenic mice and Alzheimers disease. *PNAS* 99: 13990-13995.
- Vickers J, Dickson T, Adlard P, Saunders H, King C & McCormack G (2000) The cause of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 60: 139-165.
- Washington E (2002) Nerve inflammation halts trial for Alzheimers drug. *Nature*, 415: 462.
- Whitlow, M & Filpula D (1991) Single-chain Fv proteins and their fusion proteins. *Meth. Enzymol.* 2: 97-105.
- Winblad B & Blum K (2003) Hints of a therapeutic vaccine for Alzheimer's? *Neuron* 38: 517-519
- Wolfe M (2002) Therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1: 859-866