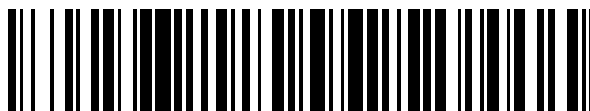


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 447 844**

51 Int. Cl.:

C07K 16/40 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2009** **E 09726513 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013** **EP 2281005**

54 Título: **Anticuerpos de dominio individual capaces de modular la actividad BACE1**

30 Prioridad:

03.04.2008 US 41965 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.03.2014

73 Titular/es:

VIB VZW (33.3%)
Rijvisschestraat 120
9052 Gent, BE;
VIB VZW (33.3%);
KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN, K.U.
LEUVEN R&D (33.3%) y
VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL (33.3%)

72 Inventor/es:

DE STROOPER, BART;
MARJAUX, ELS;
ZHOU, LUJIA y
MUYLDERMANS, SERGE

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 447 844 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos de dominio individual capaces de modular la actividad BACE1

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos de dominio individual con una especificidad para BACE1. Más específicamente, la invención proporciona anticuerpos de dominio variable individual procedentes de camélidos que se unen a BACE1 y que son capaces de inhibir la actividad de BACE1. Dichos anticuerpos se pueden usar para aplicaciones de investigación y médicas. Aplicaciones específicas incluyen el uso de anticuerpos específicos de BACE1 para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Antecedentes de la invención

La enfermedad de Alzheimer ("AD") es una enfermedad neurodegenerativa devastadora que afecta a millones de pacientes de edad avanzada a lo largo del mundo y es la causa más común atención sanitaria doméstica. La AD se caracteriza clínicamente por la pérdida progresiva de memoria, orientación, función cognitiva, juicio y estabilidad emocional. Al aumentar la edad, el riesgo de desarrollar AD aumenta exponencialmente, de manera que a los 85 años aproximadamente se ve afectado un 20-40 % de la población. La memoria y la función cognitiva se deterioran rápidamente en los 5 primeros años posteriores al diagnóstico de una disfunción de leve a moderada y la muerte debida a complicaciones de la enfermedad es una consecuencia inevitable. El diagnóstico definitivo de AD únicamente se puede hacer después de la muerte, basándose en un examen histopatológico del tejido cerebral del paciente. Dos contrastes histológicos de AD son la presencia de ovillos neurofibrilares de proteína tau hiperfosforilada y de placas amiloides proteínicas, ambos en el interior de la corteza cerebral de los pacientes con AD. Las placas amiloides están compuestas principalmente por un péptido de 37 a 43 aminoácidos designado beta-amiloide, también referido como beta-amiloide, amiloide beta o Abeta. Ahora está claro que el péptido Abeta procede de una proteína de membrana integral de tipo 1, llamada proteína precursora de beta amiloide (también referida como APP) a través de dos eventos proteolíticos secuenciales. En primer lugar, se hidroliza la APP en el sitio N-terminal de la hélice alfa transmembrana por medio de una enzima proteolítica específica denominada beta-secretasa (la proteasa BACE1 unida a membrana). El producto N-terminal soluble de este evento de escisión difunde fuera de la membrana, dejando atrás el producto de escisión C-terminal asociado a membrana, denominado C99. Posteriormente se hidroliza de manera adicional la proteína C99 dentro de la hélice alfa transmembrana por medio de una enzima proteolítica específica referida como gamma-secretasa. Este segundo evento de escisión libera el péptido Abeta y deja un "raigón" asociado a membrana. El péptido Abeta generado de este modo se segrega desde la célula al interior de la matriz extracelular donde forma finalmente las placas amiloides asociadas con AD. A pesar de la investigación intensa durante los últimos 100 años, el pronóstico de los pacientes con AD es aún el mismo que la de los pacientes hace un siglo, ya que no existe aún ninguna cura real disponible. Existen dos tipos de fármacos aprobados por la U.S. Food and Drug Administration y se usan actualmente en el ámbito clínico para tratar AD: inhibidores de acetilcolinesterasa (AChE) y memantina. Existe una amplia evidencia en la técnica de que el péptido amiloide beta, el principal componente de las placas amiloides que son específicas de la etiología de AD, juega un papel fundamental en el desarrollo de la enfermedad de AD. Por tanto, uno de las estrategias más favoritas para decrecer A β consiste en disminuir su producción por medio de inhibidores de γ - y β -secretasa. Una estrategia fue el desarrollo de inhibidores de gamma-secretasa sin embargo dichos inhibidores con frecuencia tienen como resultado efectos secundarios graves ya que la gamma-secretasa está implicada en el procesamiento proteolítico de al menos 30 proteínas. Otra estrategia atractiva es el desarrollo de inhibidores de BACE1. BACE1 se produce como un prepro péptido. El péptido de señal de 21 aminoácidos produce la translocación de la proteasa al RE donde el péptido señal se escinde y desde donde BACE1 se dirige después a la superficie celular. Tras su paso a través de la red trans-Golgi trans (TGN), parte de BACE1 se dirige a la superficie celular desde donde se introduce en el interior de los compartimientos endosómicos proximales. Posteriormente, BACE1 bien penetra en una ruta directa de reciclaje hasta la superficie celular o bien se dirige a las vesículas endosómicas lejanas destinadas para los lisosomas o para la TGN. En la TGN podría re-transportarse a la membrana celular. Debido a su prolongada semivida y a su rápida tasa de reciclaje, BACE1 madura puede ir en ciclos múltiples veces entre la superficie celular, el sistema endosómico y la TGN durante el transcurso de su vida útil. El documento US20060034848 divulga la interacción entre BACE1 y LRP y estrategias para interferir con esta interacción para el desarrollo de inhibidores de BACE1. Hussain I y cols. (2007) J. Neurochem. 100: 802-809 divulga un inhibidor de BACE1 no peptídico. En la presente invención los autores de la invención buscaron desarrollar inhibidores alternativos de la actividad de BACE1 a través de la generación de anticuerpos de cadena individual con especificidad por BACE1. En la colección resultante de aglutinantes de BACE1 los autores de la invención han identificado inhibidores de BACE1. En particular, estos anticuerpos de camélido específicos de BACE1 capaces de inhibir la actividad de BACE1 se pueden usar para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Figuras

Figura 1: alineación de la secuencia de aminoácidos del dominio variable de los HCAB de dromedario específicos de BACE1 (SEC ID N.^o: 1-14 y SEC ID N.^o: 38-43). Los residuos distintivos de V_HH (F/Y₃₇, E/Q₄₄, R₄₅ y G₄₇) están indicados en negrita, mientras que los residuos característicos de un resto-VH (L₁₁, V₃₇, G₄₄, L₄₅ y W₄₇) están

marcados en cursiva. Los residuos de cisteína diferentes de los C₉₂ y C₂₂ canónicos están subrayados. La numeración y el agrupamiento de los residuos bien en el armazón o en sus regiones CDR son como se definen por Kabat (Kabat y cols., 1991).

5 Figura 2: Capacidad de los diferentes aglutinantes de BACE1 para reconocer su antígeno.

A. Un diagrama RaPID que representa los valores de velocidad cinética k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$) y k_{off} (s^{-1}) para las interacciones nanoanticuerpo-inmunógeno según se determina por medio de resonancia de plasmón superficial (BIAcore). La proporción de k_{off} con respecto a k_{on} proporciona la constante de disociación o K_D . Se midieron las constantes cinéticas a pH 7,0 (puntos negros) y pH 5,0 (puntos rojos). La mayoría de los aglutinantes de BACE1 tienen valores de K_D entre 10 y 100 nM en ambas condiciones de pH.

B. Capacidad de los diferentes aglutinantes de BACE1 para extraer BACE1 a partir de lisados celulares. Se incubaron células SOS sometidas a transfección con BACE1 con cantidades iguales (2 µg) de los diversos nanoanticuerpos anti-BACE1 con marcados con His recombinantes. Tras la extracción de los nanoanticuerpos, se sometieron las muestras a SDS-PAGE y se analizaron por medio de prueba de bandas de Western usando anti-BACE1 (ProSci). Se usaron Nb_BCILP y Nb_Aβ, producidos frente a beta-lactamasa BCII 569/H (Conrath y cols., 2001a) y péptido Ap respectivamente, como controles negativos. Únicamente, una parte de los nanoanticuerpos, producidos frente a ectodominio de BACE1 no-glucosilado, son capaces de capturar de forma eficaz BACE1 glucosilada a partir de lisados celulares COS.

Figura 3: Efecto de Nb_B26 y Nb_B9 sobre el procesado de APP en células.

A. Representación esquemática de una construcción de ADNc usada para expresar V_HH en células de mamíferos. La estructura consiste en ADNc de V_HH, condensado en su extremo C-terminal al péptido de señal de BACE1, para garantizar la translocación de ER y está condensado en su extremo C-terminal a una marca de epitopo-myc.

B. Nb_B9, pero no Nb_B26, afecta negativamente al procesado APP de sitio-β tras la sobre-expresión transitoria. Se sometieron a co-transfección células COS-B1, que expresan de forma estable niveles bajos de BACE1, con APP_{Sw} y bien con Nb_B26 o con Nb_B9. Las células de control bien se sometieron a transfección con vector vacío o bien se sometieron a transfección con APP_{Sw} solo. Dos días después de la transfección, las células se lisaron y se analizaron los extractos totales de proteína por prueba de bandas de Western usando anti-myc, anti-BACE1 (ProSci) y B63.1, para detectar longitud completa de V_HH, BACE1 y APP y CTF (C83 y C99), respectivamente. Se muestra un experimento representativo.

C. Se sondearon las pruebas de bandas de Western como el que se observa en C con GARIR800, un anticuerpo secundario acoplado con infrarrojos y posteriormente se exploraron en un escáner Odyssey. Se cuantificó la intensidad de señal de APP CTFs usando el soporte lógico Odyssey Application v1.2.15 (LI-COR). La proporción de CTF-β con respecto a CTF totales (media ± EEM, n = 8 a 10), normalizada con respecto a la proporción de células no sometidas a transfección (comentada como 1), muestra que Nb_B9 podría disminuir de manera uniforme la actividad en aproximadamente el 30 % (ensayo-t, p < 0,001), mientras que Nb_B26 no tuvo impacto alguno sobre el procesado de APP.

Figura 4: V_HH Nb_B9 inhibe la escisión de β-secretasa de APP por medio de adición de células cultivadas al medio. Se trataron células de neuroblastoma SH-SY5Y/APPwt con nanoanticuerpos 3 µM durante 24 horas, se analizaron sAPPα y sAPPβ procedentes de medio acondicionado por prueba de bandas de Western. Las células tratadas con nanoanticuerpo B9 (SEC ID N.º: 6) mostraron una disminución significativa en la producción de sAPPβ.

Figura 5. Alineación de secuencia de aminoácidos de V_HH específica de BACE1 aislada a partir de bibliotecas de V_HH de dromedario y llama. La numeración y el agrupamiento de residuos bien en armazón o bien en regiones CDR son como se definen por Kabat (Kabat y cols., 1991).

Figura 6. Análisis de prueba de bandas de Western de sAPPβ y sAPPα de medio acondicionado de células de neuroblastoma SH-SY5Y/APPwt tratadas con nanoanticuerpos por medio de adición al medio a una concentración final de 20 µM. Las células tratadas con nanoanticuerpo B9 (SEC ID N.º: 6), 10C4 (SEC ID N.º: 22) y 4A2 (SEC ID N.º: 26) mostraron una disminución significativa de la producción de sAPPβ.

Figura 7. Los efectos de inhibición de los diferentes nanoanticuerpos (10 µM) sobre la actividad de BACE1 en el ensayo de FRET a una concentración de 10 µM. En este ensayo enzimático libre de células, Nb_B9 (SEC ID N.º: 6), Nb_10C4 (SEC ID N.º: 22), Nb_4A2 (SEC ID N.º: 26) y Nb_1B3 (SEC ID N.º: 15) modulan de forma significativa la actividad de BACE1.

Figura 8. Curva de dosis-respuesta de nanoanticuerpos 10C4 (A), 4A2 (B) y B9 (C) sobre la actividad de escisión de BACE1 en el ensayo de FRET usando un sustrato de péptido pequeño. Nb_10C4 y Nb_4A2 inhiben significativamente la actividad de BACE1. Nb_B9 aumenta significativamente la actividad de BACE1.

Figura 9. Curva de dosis-respuesta de Nb_B9 sobre la actividad de escisión de BACE1 en MBP-ELISA usando un sustrato de péptido grande. En este ensayo enzimático libre de células, Nb_B9 inhibe significativamente la actividad de BACE1.

Figura 10. V_HH Nb_B9 (SEC ID N.º: 6) y Nb_4A2 (SEC ID N.º: 26) inhiben la escisión de BACE1 de APPwt en neuronas de ratón de cultivos primarios, como queda reflejado en una disminución de Aβ, sAPPβ y CTFβ. Se sometieron a transducción neuronas de cultivos primarios de ratones de tipo silvestre con APPwt por medio de virus del bosque de Semliki (SFV) y posteriormente se trataron con Nb_B9 purificado y Nb_4A2 añadiendo al medio a una concentración final de 20 μM (los V_HHs se disolvieron en primer lugar en PBS), se usaron neuronas tratadas con PBS como un control negativo. Transcurridas 16 horas de tratamiento, se analizaron APP-FL, CTFβ, CTFα, Aβ, sAPPβ y sAPPα/β en el medio acondicionado y el extracto celular por prueba de bandas de Western.

Figura 11. Curva de dosis respuesta de V_HH Nb_B9 (SEC ID N.º: 6) que inhibe BACE1 en neuronas de ratón de cultivos primarios establecidas por ensayos de etiquetado metabólico de marcaje tras 6 horas de tratamiento. Se sometieron a transducción neuronas de cultivos primarios de ratones tipo silvestre con APPwt por medio de virus del bosque de Semliki (SFV) y se trataron con V_HH B9 purificado por medio de adición de diluciones seriadas al medio (en primer lugar V_HH B9 se disolvió y se diluyó en PBS). Los cultivos neuronales se marcaron metabólicamente durante 6 horas, y se analizaron APP-FL y CTFβ de los extractos celulares por formación de imágenes de fósforo, al tiempo que se analizaron sAPPβ, Aβ y sAPPα del medio acondicionado por prueba de bandas de Western.

Objetivos y descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos de dominio variable individual de BACE1 que se pueden usar en aplicaciones de investigación y médicas. Más específicamente, la invención se refiere a la detección de la sobre-expresión de BACE1 y al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer usando anticuerpos de dominio individual BACE1. En la presente invención, los anticuerpos están desprovistos de cualquier cadena ligera pero comprenden al menos un anticuerpo de cadena pesada. En una realización particular, el dominio variable de un anticuerpo de cadena pesada procede de camélidos. Dicho anticuerpo de cadena pesada de dominio variable se designa en el presente documento como un Nanoanticuerpo o un anticuerpo V_HH. Nanoanticuerpo (TM), Nanoanticuerpos (TM) y Nanoclon (TM) son nombres comerciales de Ablynx NV (Bélgica).

De este modo, en una primera realización, la invención proporciona un anticuerpo de dominio variable individual, desprovisto de una cadena ligera, que se une específicamente a BACE1, que es capaz de inhibir la escisión de la proteína precursora de beta amiloide (APP) tal como se determina en un ensayo celular. En una realización particular dicho anticuerpo de dominio individual procede de camélidos. La familia de los "camélidos" comprende los camélidos del viejo mundo (*Camelus bactrianus* y *Camelus dromedarius*) y los camélidos del nuevo mundo (por ejemplo *Lama paccos*, *Lama glama* y *Lama vicugna*).

En otra realización la invención proporciona un anticuerpo de dominio individual procedente de camélidos cuya secuencia de aminoácidos comprende SEC ID N.ºs: 1-28. Las secuencias de aminoácidos de los Nanoanticuerpos de dromedario/llama (también designados como anticuerpos V_HH) se muestran en las Figuras 1 y 5. El Nanoanticuerpo B1 (Nb_B1) corresponde a SEC ID N.º: 1, el Nanoanticuerpo B2 (Nb_B2) corresponde a SEC ID N.º: 2, el Nanoanticuerpo B3 (Nb_B3) corresponde a SEC ID N.º: 3, el Nanoanticuerpo B5 (Nb_B5) corresponde a SEC ID N.º: 4, el Nanoanticuerpo B8 (Nb_B8) corresponde a SEC ID N.º: 5, el Nanoanticuerpo B9 (Nb_B9) corresponde a SEC ID N.º: 6, el Nanoanticuerpo B10 (Nb_B10) corresponde a SEC ID N.º: 7, el Nanoanticuerpo B11 (Nb_B11) corresponde a SEC ID N.º: 8, el Nanoanticuerpo B12 (Nb_B12) corresponde a SEC ID N.º: 9, el Nanoanticuerpo B15 (Nb_B15) corresponde a SEC ID N.º: 10, el Nanoanticuerpo B16 (Nb_B16) corresponde a SEC ID N.º: 11, el Nanoanticuerpo B21 (Nb_B21) corresponde a SEC ID N.º: 12, el Nanoanticuerpo B25 (Nb_B25) corresponde a SEC ID N.º: 13, el Nanoanticuerpo B26 (Nb_B26) corresponde a SEC ID N.º: 14, el Nanoanticuerpo 1B3 (Nb_1B3) corresponde a SEC ID N.º: 15, el Nanoanticuerpo 10C2 (Nb_10C2) corresponde a SEC ID N.º: 16, el Nanoanticuerpo 12B6 (Nb_12B6) corresponde a SEC ID N.º: 17, el Nanoanticuerpo 10B5 (Nb_10B5) corresponde a SEC ID N.º: 18, el Nanoanticuerpo 13A5 (Nb_13A5) corresponde a SEC ID N.º: 19, el Nanoanticuerpo 2C6 (Nb_2C6) corresponde a SEC ID N.º: 20, el Nanoanticuerpo 6A4 (Nb_6A4) corresponde a SEC ID N.º: 21, el Nanoanticuerpo 10C4 (Nb_10C4) corresponde a SEC ID N.º: 22, el Nanoanticuerpo 13B6 (Nb_13B6) corresponde a SEC ID N.º: 23, el Nanoanticuerpo 1A4 (Nb_1A4) corresponde a SEC ID N.º: 24, el Nanoanticuerpo 2B6 (Nb_2B6) corresponde a SEC ID N.º: 25, el Nanoanticuerpo 4A2 (Nb_4A2) corresponde a SEC ID N.º: 26, el Nanoanticuerpo 1D4 (Nb_1D4) corresponde a SEC ID N.º: 27 y el Nanoanticuerpo 9D3 (Nb_9D3) corresponde a SEC ID N.º: 28.

En todavía otra realización dicho anticuerpo de dominio individual es capaz de inhibir la actividad de BACE1. Se entiende que "inhibición de la actividad" es equivalente a la expresión "regular a la baja la actividad". Generalmente, inhibición significa que la actividad de BACE1 está inhibida en al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o incluso el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o incluso el 100 %. La inhibición de BACE1 se puede determinar como se menciona en el

presente documento de forma adicional en los ejemplos.

En todavía otra realización, dicho anticuerpo de dominio individual es capaz de inhibir la actividad de BACE1 y comprende al menos una de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que comprende SEC ID N.^{os}: 29-37.

En todavía otra realización, dicho anticuerpo de dominio individual es capaz de evitar la captación de pro-BACE1 y su secuencia de aminoácidos comprende SEC ID N.^{os}: 6, 22 o 26.

Debería apreciarse que el término Nanoanticuerpo según se usa en el presente documento en su sentido más amplio no está limitado a una fuente biológica específica o a un procedimiento de preparación específico. Por ejemplo, los Nanoanticuerpos de la invención de forma general se pueden obtener: (1) aislando el dominio V_HH de un anticuerpo de cadena pesada de origen natural; (2) por expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio V_HH de origen natural; (3) por "humanización" de un dominio V_HH de origen natural o por expresión de un ácido nucleico que codifica dicho dominio V_HH humanizado; (4) por "camelización" de un dominio VH de origen natural de cualquier especie animal y en particular de especies de mamíferos, tal como de un ser humano, o por expresión de un ácido nucleico que codifica dicho dominio VH camelizado; (5) por "camelización" de un "anticuerpo de dominio" o "Dab" como se describe en la técnica, o por expresión de un ácido nucleico que codifica dicho dominio de VH camelizado; (6) usando técnicas sintéticas o semi-sintéticas para la preparación de proteínas, polipéptidos u otras secuencias de aminoácidos conocidas de por sí; (7) preparando un ácido nucleico que codifica un Nanoanticuerpo usando técnicas para síntesis de ácidos nucleicos conocidas de por sí, seguido por expresión del ácido nucleico obtenido de este modo; y/o (8) por cualquier combinación de uno o más de los anteriores. Una clase preferida de Nanoanticuerpos corresponde a los dominios V_HH de anticuerpos de cadena pesada de origen natural dirigidos contra BACE1. Como se describe de manera adicional en el presente documento, dichas secuencias V_HH se pueden generar de manera general o se pueden obtener inmunizando apropiadamente una especie de camélido con BACE1, (es decir, para aumentar una respuesta inmunológica y/o anticuerpos de cadena pesada dirigidos contra BACE1), obteniendo una muestra biológica apropiada a partir de dicho camélido (tal como una muestra de sangre, muestra de suero o muestra de células-B) y generando secuencias de V_HH dirigidas contra BACE1, partiendo de dicha muestra, usando cualquier técnica apropiada conocida de por sí. Dichas técnicas resultarán evidentes para la persona experta. De manera alternativa, dichos dominios V_HH de origen natural contra BACE1 se pueden obtener a partir de bibliotecas sin tratamiento anterior de secuencias de V_HH de camélidos, por ejemplo evaluando dicha biblioteca usando BACE1 o al menos una de sus partes, fragmentos, determinantes antigénicos o epítopos usando una o más técnicas de detección conocidas de por sí. Dichas bibliotecas y técnicas por ejemplo se describen en los documentos WO 9937681, WO 0190190, WO 03025020 y WO 03035694. Alternativamente, se pueden usar bibliotecas sintéticas o semi-sintéticas mejoradas procedentes de bibliotecas de V_HH sin tratamiento anterior, tal como librerías de V_HH obtenidas a partir de bibliotecas de V_HH sin tratamiento anterior por medio de técnicas tales como mutagénesis al azar y/o redistribución de CDR, como por ejemplo se describe en el documento WO 0043507. Todavía otra técnica para obtener secuencias de V_HH dirigidas contra BACE1 implica inmunizar de forma apropiada un mamífero transgénico que es capaz de expresar anticuerpos de cadena pesada (es decir, para aumentar una respuesta inmunológica y/o anticuerpos de cadena pesada dirigidos contra BACE1), obteniendo una muestra biológica apropiada a partir de dicho mamífero transgénico (tal como una muestra de sangre, muestra de suero o muestra de células-B) y generando posteriormente secuencias de V_HH dirigidas contra BACE1 partiendo de dicha muestra, usando cualquier técnica apropiada conocida de por sí. Por ejemplo, para este fin, se pueden usar los ratones que expresan anticuerpos de cadena pesada y los procedimientos y técnicas adicionales descritos en el documento WO 02085945 y en el documento WO 04049794.

Una clase particularmente preferida de Nanoanticuerpos de la invención comprende Nanoanticuerpos con una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio de V_HH de origen natural, pero que se ha "humanizado", es decir, sustituyendo uno o más residuos de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de dicha secuencia de V_HH de origen natural (y en particular en las secuencias de armazón) por uno o más de los residuos de aminoácido que aparecen en la(s) posición(es) correspondiente(s) en un dominio VH a partir de un anticuerpo de cadena-4 convencional de un ser humano. Esto se puede llevar a cabo de una manera conocida de por sí, lo que resultará evidente para la persona experta, por ejemplo sobre la base de la descripción adicional en el presente documento y la técnica anterior sobre humanización referida en el presente documento. De nuevo, se debería apreciar que dichos Nanoanticuerpos humanizados de la invención se pueden obtener por medio de cualquier manera adecuada conocida de por sí (es decir, como viene indicado con los puntos (1)-(8) anteriores) y de este modo, no están estrictamente limitados a los polipéptidos que se han obtenido usando un polipéptido que comprende un dominio V_HH de origen natural como un material de partida. Otra clase particularmente preferida de Nanoanticuerpos de la invención comprende Nanoanticuerpos con una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos del dominio VH de origen natural, pero que se ha "camelizado", es decir, sustituyendo uno o más residuos de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de un dominio VH de origen natural de un anticuerpo de cadena-4 convencional por uno o más residuos de aminoácido que aparecen en la(s) posición(es) correspondiente(s) en un dominio V_HH de un anticuerpo de cadena pesada. Dichas sustituciones de "camelización" preferentemente se insertan en las posiciones de los aminoácidos que forman y/o están presentes en la interfaz VH-VL, y/o en los denominados residuos distintivos de Camelidae, según se define en el presente documento (véase por ejemplo el documento WO9404678). Preferentemente, la secuencia VH que se usa como

material de partida o punto de partida para generar o designar el Nanoanticuerpo camelizado es preferentemente una secuencia de VH procedente de un mamífero, más preferentemente la secuencia VH de un ser humano, tal como una secuencia VH3. No obstante, debería apreciarse que dichos Nanoanticuerpos camelizados de la invención se pueden obtener por medio de cualquier forma apropiada conocida de por sí (es decir, como viene indicado en los puntos (1)-(8) anteriores) y de este modo, no están estrictamente limitados a polipéptidos que se han obtenido usando un polipéptido que comprende un dominio VH de origen natural como material de partida. Por ejemplo tanto la "humanización" como la "camelización" se pueden llevar a cabo proporcionando una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio V_HH de origen natural o un dominio VH de origen natural, respectivamente y posteriormente modificando, de una manera conocida de por sí, uno o más codones de dicha secuencia de nucleótidos de tal manera que la nueva secuencia de nucleótidos codifique un Nanoanticuerpo "humanizado" o "camelizado" de la invención, respectivamente. Posteriormente este ácido nucleico se puede expresar de manera conocida de por sí, para proporcionar el Nanoanticuerpo deseado de la invención. Alternativamente, en base a la secuencia de aminoácidos del dominio V_HH de origen natural o dominio VH de origen natural, respectivamente, la secuencia de aminoácidos del Nanoanticuerpo humanizado o camelizado deseado de la invención, respectivamente, se puede diseñar y posteriormente sintetizar de novo usando técnicas para la síntesis de péptidos conocidas de por sí. También, basándose en la secuencia de aminoácidos o en la secuencia de nucleótidos de un dominio V_HH de origen natural o dominio VH de origen natural, respectivamente, se puede diseñar y posteriormente sintetizar de novo una secuencia de nucleótidos que codifica el Nanoanticuerpo humanizado o camelizado deseado de la invención, respectivamente, usando técnicas para la síntesis de ácido nucleico conocidas de por sí, después de lo que el ácido nucleico obtenido de este modo se puede expresar de una manera conocida de por sí, tal como para proporcionar el Nanoanticuerpo deseado de la invención. Otros procedimientos y técnicas apropiados para la obtención de Nanoanticuerpos de la invención y/o ácidos nucleicos que codifican los mismos, partiendo de secuencias de VH de origen natural o preferentemente secuencias de V_HH de origen natural, resultarán evidentes para la persona experta y pueden comprender por ejemplo combinar una o más partes de una o más secuencias de VH de origen natural (tal como una o más secuencias de FR y/o secuencias de CDR), una o más partes de una o más secuencias de V_HH de origen natural (tal como una o más secuencias de FR o secuencias de CDR) y/o una o más secuencias sintéticas o semi-sintéticas, de manera apropiada, tal como para proporcionar un Nanoanticuerpo de la invención o una secuencia de nucleótidos o ácido nucleico que codifica la misma.

De acuerdo con un aspecto no limitante de la invención, un Nanoanticuerpo puede ser según se define en el presente documento, pero con la condición de que tenga al menos "una diferencia de un aminoácido" (según se define en el presente documento) en al menos una de las regiones de armazón en comparación con la región de armazón correspondiente de un dominio VH de origen natural y en particular en comparación con la región de armazón correspondiente de DP-47. Más específicamente, de acuerdo con un aspecto no limitante de la invención, un Nanoanticuerpo puede ser según se define en el presente documento, pero con la condición de que tenga al menos "una diferencia de un aminoácido" (según se define en el presente documento) en al menos uno de los residuos Distintivos (incluyendo aquellos en las posiciones 108, 103 y/o 45), en comparación con la región de armazón correspondiente de un dominio VH de origen natural y en particular en comparación con la correspondiente región de armazón de DP-47. Normalmente, un Nanoanticuerpo tendrá al menos dicha diferencia de un aminoácido con un dominio de VH de origen natural en al menos uno de FR2 y/o FR4 y en particular al menos en uno de los residuos Distintivos en FR2 y/o FR4 (de nuevo, incluyendo aquellos en las posiciones 108, 103 y/o 45). De igual forma, un Nanoanticuerpo humanizado de la invención puede ser según se define en el presente documento, pero con la condición de que tenga al menos una "diferencia de un aminoácido" (según se define en el presente documento) en al menos una de las regiones de armazón en comparación con la región de armazón correspondiente de un dominio de V_HH de origen natural. De manera más específica, de acuerdo con un aspecto no limitante de la invención, un Nanoanticuerpo puede ser según se define en el presente documento, pero con la condición de que tenga al menos una "diferencia de un aminoácido" (según se define en el presente documento) en al menos uno de los residuos Distintivos (incluyendo aquellos en las posiciones 108, 103 y/o 45), en comparación con la región de armazón correspondiente de un dominio V_HH de origen natural. Normalmente, un Nanoanticuerpo tendrá al menos dicha diferencia de un aminoácido con un dominio V_HH de origen natural en al menos uno de FR2 y/o FR4 y en particular al menos uno de los residuos de Contraste en FR2 y/o FR4 (de nuevo, incluyendo aquellos en las posiciones 108, 103 y/o 45). Como resultará evidente a partir de la descripción de la presente memoria, también se encuentra dentro del alcance de la invención el uso de análogos sintéticos o naturales, mutantes, variantes, alelos, homólogos y ortólogos (citados de manera colectiva en el presente documento como "análogos") de los Nanoanticuerpos de la invención según se definen en el presente documento y en particular los análogos de los Nanoanticuerpos de SEC ID N.^{os}: 6, 22 o 26. De este modo, de acuerdo con una realización de la invención, la expresión "Nanoanticuerpo de la invención", en su sentido más amplio, también abarca dichos análogos. Generalmente, en dichos análogos, se pueden haber sustituido, eliminado y/o añadido uno o más residuos de aminoácidos, en comparación con los Nanoanticuerpos de la invención como se definen en el presente documento. Dichas sustituciones, inserciones o eliminaciones se pueden llevar a cabo en una o más regiones de armazón y/o en uno o más de los CDR y en particular en los análogos de los CDR de los Nanoanticuerpos de SEC ID N.^{os}: 6, 22 o 26, correspondiendo dichos CDR a SEC ID N.^{os}: 29-37 (véase la Tabla 1, Figura 1, Figura 5).

Tabla 1: CDR de nanoanticuerpos específicos de BACE1

Nb	CDR1	CDR2	CDR3
----	------	------	------

Nb_B9 (SEC ID N.º: 6)	EYTYGYCSMG (SEC ID N.º: 29)	TITSDGSTSYVDSVKG (SEC ID N.º: 30)	KTCANKLGAKFIS (SEC ID N.º: 31)
Nb_10C4 (SEC ID N.º: 22)	GYTYSTCSMA (SEC ID N.º: 32)	SIRNDGSTAYADSVKG (SEC ID N.º: 33)	RIGVGPGGTCSIYAPY (SEC ID N.º: 34)
Nb_4A2 (SEC ID N.º: 26)	GFTFETQYMT (SEC ID N.º: 35)	SINSGGTIKYYANSSVKG (SEC ID N.º: 36)	GQWAGVGAASS (SEC ID N.º: 37)

Cuando se llevan a cabo dichas sustituciones, inserciones o eliminaciones en una o más de las regiones de
 almacén, se pueden llevar a cabo en uno o más de los residuos Distintivos y/o en una o más de otras posiciones de
 los residuos de almacén. Generalmente las sustituciones, inserciones o eliminaciones en los residuos de Distintivos
 son menos preferidas (a menos que sean sustituciones de humanización como se describen en el presente
 documento). Por medio de los ejemplos no limitantes, una sustitución puede ser por ejemplo una sustitución
 conservadora (como se describe en el presente documento) y/o se puede sustituir un residuo de aminoácido por otro
 residuos de aminoácido que aparece de forma natural en la misma posición en otro dominio V_HH. De este modo, una
 o más sustituciones, eliminaciones o inserciones, o cualquiera de sus combinaciones, que bien mejoren las
 propiedades del Nanoanticuerpo de la invención o bien que al menos no deterioren demasiado las propiedades
 deseadas o el equilibrio o la combinación de propiedades deseadas del Nanoanticuerpo de la invención (es decir, en
 el grado en el que el Nanoanticuerpo ya no resulte apropiado para su uso deseado) están incluidas dentro del
 alcance de la invención. Generalmente una persona experta será capaz de determinar y seleccionar las
 sustituciones, eliminaciones o inserciones apropiadas, o combinaciones apropiadas de las mismas, en base a la
 divulgación de la presente memoria y opcionalmente tras un grado limitado de experimentación rutinaria que, por
 ejemplo, puede implicar introducir un número limitado de posibles sustituciones y la determinar su influencia sobre
 las propiedades de los Nanoanticuerpos obtenidos de este modo. Por ejemplo y dependiendo del organismo
 hospedador usado para expresar el Nanoanticuerpo o polipéptido de la invención, dichas eliminaciones y/o
 sustituciones pueden estar diseñadas de tal forma que se retiren uno o más sitios de modificación postraducciona
 (tal como uno o más sitios de glucosilación), como estará dentro de la capacidad de la persona experta.
 Alternativamente, se pueden diseñar las sustituciones o inserciones tales como para introducir uno o más sitios para
 la unión de grupos funcionales (como se describe en el presente documento), por ejemplo para permitir la pegilación
 específica de sitio. Una clase preferida de análogos de los Nanoanticuerpos de la invención comprende
 Nanoanticuerpos que se han humanizado (es decir, en comparación con la secuencia de un Nanoanticuerpo de
 origen natural de la invención). Como se ha mencionado en la técnica anterior citada en el presente documento,
 generalmente dicha humanización implica sustituir uno o más residuos de aminoácido de la secuencia de un V_HH de
 origen natural por los residuos de aminoácido que aparecen en la misma posición de un dominio de VH humano, tal
 como un dominio VH3 humano. Ejemplos de posibles sustituciones de humanización o combinaciones de
 sustituciones de humanización resultarán evidentes para la persona experta, a partir de las posibles sustituciones de
 humanización mencionadas en la técnica antecedente citada en el presente documento, y/o a partir de la
 comparación entre la secuencia de un Nanoanticuerpo y la secuencia de un dominio VH humano de origen natural.
 Las sustituciones de humanización se deberían escoger de manera que los Nanoanticuerpos humanizados
 resultantes todavía conserven las propiedades favorables de los Nanoanticuerpos según se definen en el presente
 documento y más preferentemente de manera que sean como se ha descrito para los análogos de los párrafos
 anteriores. Generalmente una persona experta será capaz de determinar y escoger las sustituciones de
 humanización apropiadas o las combinaciones apropiadas de sustituciones de humanización, basándose en la
 descripción y de manera opcional tras un grado limitado de experimentación rutinaria que por ejemplo implica
 introducir un número limitado de posibles sustituciones de humanización y la determinar su influencia sobre las
 propiedades de los Nanoanticuerpos obtenidos de este modo. Generalmente, como resultado de la humanización,
 los Nanoanticuerpos de la invención pueden convertirse en más "parecidos a humanos", al tiempo que todavía
 conservan las propiedades favorables de los Nanoanticuerpos de la invención como se han descrito en el presente
 documento. Como un resultado, dichos Nanoanticuerpos humanizados pueden tener varias ventajas, tales como
 menor carácter inmunogénico, en comparación con los correspondientes dominios V_HH de origen natural. De nuevo,
 basándose en la divulgación del presente documento y opcionalmente tras un grado limitado de experimentación
 rutinaria, la persona experta será capaz de seleccionar sustituciones de humanización o combinaciones apropiadas
 de sustituciones de humanización que optimicen o logren un equilibrio deseado o apropiado entre las propiedades
 favorables proporcionadas por medio de las sustituciones de humanización por una parte y las propiedades
 favorables de los dominios V_HH de origen natural por otra parte. Ejemplos de dichas modificaciones, así como
 ejemplos de residuos de aminoácidos dentro de la secuencia de Nanoanticuerpos que se pueden modificar de dicha
 manera (es decir, bien sobre la cadena principal de proteína pero bien preferentemente sobre una cadena lateral),
 procedimientos y técnicas que se pueden usar para introducir dichas modificaciones y los usos y ventajas
 potenciales de dichas modificaciones resultarán evidentes para la persona experta. Por ejemplo, dicha modificación
 puede implicar la introducción (por ejemplo, por medio de unión covalente o de otra manera apropiada) de uno o
 más grupos funcionales, residuos o restos en el interior o sobre el Nanoanticuerpo de la invención y en particular de
 uno o más grupos funcionales, residuos o restos que confieren una o más propiedades o funcionalidades deseadas
 del Nanoanticuerpo de la invención. Ejemplo de dichos grupos funcionales resultará evidente para la persona
 experta. Ejemplos de dichos grupos funcionales y de técnicas para su introducción resultarán evidentes para la
 persona experta y generalmente pueden comprender todos los grupos funcionales y técnicas mencionadas en la

técnica de antecedentes general citada anteriormente así como los grupos funcionales y las técnicas conocidas de por sí por la modificación de las proteínas farmacéuticas y en particular por la modificación de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (incluyendo ScFv's y anticuerpos de dominio individual), para los que se hace referencia por ejemplo a Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1980). Dichos grupos funcionales por ejemplo se pueden unir directamente (por ejemplo covalentemente) a un Nanoanticuerpo de la invención, o de manera opcional por medio de un agente de enlace o espaciador, como de nuevo resultará evidente para la persona experta. Una de las técnicas más ampliamente usadas para aumentar la semivida y/o reducir el carácter inmunogénico de las proteínas farmacéuticas comprende la unión de un polímero farmacológicamente aceptable apropiado, tal como poli(etilenglicol) (PEG) o sus derivados (tales como metoxipoli(etilenglicol) o mPEG). De manera general, se puede usar cualquier forma de pegilación, tal como la pegilación usada en la técnica para los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpo (incluyendo pero no limitados a anticuerpos de dominio (individual) y ScFV's); se hace referencia por ejemplo a Chapman, Nat. Biotechnol. 54, 531-545 (2002); por Veronese y Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003), por Harris y Chess, Nat. Rev. Drug. Discov. 2, (2003) y en el documento WO04060965. También se encuentran disponibles comercialmente diversos reactivos para la pegilación de proteínas, por ejemplo de Nektar Therapeutics, EE.UU. Preferentemente, se usa la pegilación dirigida a sitio, en particular por medio de un residuo de cisteína (véase por ejemplo Yang y cols., Protein Engineering, 16, 10, 761-770 (2003). Por ejemplo, para este fin, se puede unir PEG a un residuo de cisteína de origen natural en un Nanoanticuerpo de la invención, se puede modificar un Nanoanticuerpo de la invención tal como para introducir de forma apropiada uno o más residuos de cisteína para la unión de PEG, o se puede condensar una secuencia de aminoácidos que comprende uno o más residuos de cisteína para la unión de PEG con el extremo N-terminal o C-terminal de un Nanoanticuerpo de la invención, todo ello usando técnicas de ingeniería de proteínas conocidas de por sí por la persona experta. Preferentemente, para los Nanoanticuerpos y las proteínas de la invención, se usa un PEG con un peso molecular de más de 5.000, tal como más de 10.000 y menos de 200.000, tal como menos de 100.000; por ejemplo, dentro del intervalo de 20.000-80.000. Otra modificación, normalmente menos preferida, comprende la glucosilación unida a N o unida a O, normalmente como parte de una modificación co-translacional y/o pos-translacional, dependiendo de la célula hospedadora usada para expresar el Nanoanticuerpo o el polipéptido de la invención. Aún otra modificación puede comprender la introducción de una o más etiquetas detectables u otros grupos o restos de generación de señal, dependiendo del uso pretendido del Nanoanticuerpo marcado. Etiquetas apropiadas y técnicas para unirlos, usarlos y detectarlos resultarán evidentes para la persona experta y por ejemplo incluyen, pero no están limitadas a, marcadores fluorescentes (tales como fluoresceína, isotiocianato, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído y fluorescamina y metales fluorescentes tales como Eu u otros metales a partir de la serie de los lantánidos), marcadores fosforescentes, marcadores quimioluminiscentes o marcadores bioluminiscentes (tales como luminal, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sales de acridinio, éster de oxalato, dioxetano o GFP y sus análogos), radio-isótopos, metales, quelatos de metal o cationes metálicos u otros metales o cationes metálicos que son particularmente apropiados para su uso en diagnóstico y formación de imágenes in vivo, in vitro o in situ, así como cromóforos y enzimas (tales como malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-V-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levaduras, alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, biotinavidina peroxidasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-VI-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolina esterasa). Otros marcadores apropiados resultarán evidentes para la persona experta y por ejemplo incluyen restos que pueden ser detectados usando espectroscopia de RMN o ESR. Tales Nanoanticuerpos marcados y polipéptidos de la invención se pueden usar por ejemplo para ensayos in vitro, in vivo o in situ (incluyendo inmunoensayos conocidos de por sí tales como ELISA, RIA, EIA y otros "ensayos de tipo sándwich", etc.), así como también con fines diagnósticos in vivo y formación de imágenes in vivo, dependiendo de la elección de la etiqueta específica. Como resultará evidente para la persona experta, otra modificación puede implicar la introducción de un grupo quelante, por ejemplo para formar quelatos con uno de los metales o cationes metálicos referidos anteriormente. Grupos quelantes apropiados por ejemplo incluyen, sin limitación, ácido dietil-enetriaminapentacético (DTPA) o ácido etilendiaminatetracético (EDTA). Todavía otra modificación puede comprender la introducción de un grupo funcional que es una parte de un par de enlace específico, tal como el par de unión biotina-(estrept)avidina. Se puede usar dicho grupo funcional para unir el Nanoanticuerpo de la invención a otra proteína, polipéptido o compuesto químico que está unido a la otra mitad del par de enlace, es decir, a través de la formación del par de enlace. Por ejemplo, se puede conjugar un Nanoanticuerpo de la invención con biotina y se puede unir a otra proteína, polipéptido, compuesto o vehículo conjugado con avidina o estreptavidina. Por ejemplo, se puede usar dicho Nanoanticuerpo conjugado como in indicador, por ejemplo en un sistema de diagnóstico en el que se conjuga un agente productor de señal detectable con avidina o estreptavidina. Dichos pares de enlace también se pueden usar por ejemplo para unir el Nanoanticuerpo de la invención a un vehículo, incluyendo vehículos apropiados con fines farmacéuticos. Un ejemplo no limitante son las formulaciones liposómicas descritas por Cao y Suresh, Journal of Drug Targeting, 8, 4, 257 (2000). También se pueden usar dichos pares para unir un agente terapéuticamente activo al Nanoanticuerpo de la invención.

De manera general, se espera que los Nanoanticuerpos y los polipéptidos de la invención se unan a todos los análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos de origen natural de BACE1, o al menos a aquellos análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos de BACE1 que contengan uno o más determinantes antigénicos o epítopos que sean esencialmente los mismos que el(los) determinante(s) antigénico(s) o el(los) epítopo(s) a los que se unen los Nanoanticuerpos y polipéptidos de la invención en BACE1 (por ejemplo, en BACE1

de tipo silvestre). De nuevo, en tal caso, los Nanoanticuerpos y polipéptidos de la invención se pueden unir a dichos análogos, variantes, mutantes, alelos y fragmentos con afinidad y/o especificidad que son las mismas o diferentes de (es decir, más altas o más bajas que) la afinidad y especificidad con la que los Nanoanticuerpos de la invención se unen a BACE1 (tipo silvestre). También se incluye dentro del alcance de la invención que los Nanoanticuerpos y polipéptidos de la invención se unen a algunos análogos, variantes, mutantes, alelos, partes y fragmentos de BACE1, pero no a otros. De igual forma, a la hora de determinar el grado de identidad de secuencia entre las dos secuencias de aminoácidos, la persona experta puede tener en cuenta las denominadas sustituciones de aminoácidos "conservadoras" que de manera general se pueden describir como sustituciones de aminoácidos en los que el residuo de aminoácido está reemplazado por otro residuo de aminoácido de estructura química similar y que tiene escasa o esencialmente nula influencia sobre la función, actividad u otras propiedades biológicas del polipéptido. Dichas sustituciones de aminoácidos conservadoras se conocen bien en la técnica, por ejemplo a partir de los documentos WO04037999, WO9849185, WO0046383 y WO0109300; y los tipos (preferidos) y/o combinaciones de dichas sustituciones se pueden seleccionar sobre la base de las consideraciones pertinentes del documento WO04037999 así como del documento WO9849185. Preferentemente dichas sustituciones conservadoras son sustituciones en las que está sustituido un aminoácido dentro de los grupos siguientes (a)-(e) por otro residuo de aminoácido dentro del mismo grupo: (a) residuos pequeños alifáticos no polares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro y Gly; (b) residuos polares cargados negativamente y sus amidas (no cargadas): Asp, Asn, Glu y Gln; (c) residuos polares cargados positivamente: His, Arg y Lys; (d) residuos grandes alifáticos no polares: Met, Leu, He, Val y Cys; y (e) residuos aromáticos: Phe, Tyr y Trp. Las sustituciones conservadoras particularmente preferidas son las siguientes: Ala por Gly o por Ser; Arg por Lys; Asn por Gln o por His; Asp por Glu; Cys por Ser; Gln por Asn; Glu por Asp; Gly por Ala o por Pro; His por Asn o Gln; He por Leu o por Val; Leu por He o por Val; Lys por Arg, por Gln o por Glu; Met por Leu, por Tyr o por He; Phe por Met, por Leu o por Tyr; Ser por Thr; Thr por Ser; Trp por Tyr; Tyr por Trp; y/o Phe por Val, por He o por Leu.

Las sustancias terapéuticas polipeptídicas y en particular las sustancias terapéuticas basadas en anticuerpos tienen un potencial importante como fármacos debido a que tienen una especificidad exquisita para sus dianas y una toxicidad inherente baja. No obstante, se sabe por parte de la persona experta que un anticuerpo que ha sido obtenido para una diana terapéuticamente útil requiere modificación adicional con el fin de prepararlo para terapia humana, con el fin de evitar una reacción inmunológica no deseada en un individuo humano tras la administración. El procedimiento de modificación se denomina comúnmente "humanización". Se conoce por el trabajador experto que los anticuerpos producidos en especies, diferentes de humanos, requieren humanización para volver al anticuerpo terapéuticamente útil en seres humanos ((1) injertando CDR: Protein Design Labs: documentos US6180370, US5693761; Genentech documento US6054297; Celltech: documentos EP 626390, US5859205; (2) revistiendo: Xoma: documentos US5869619, US5766886, US5821123). Existe una necesidad de un procedimiento para producir anticuerpos que eviten el requisito de humanización sustancial, o que obvien completamente la necesidad de humanización. Existe una necesidad de una nueva clase de anticuerpos que tengan regiones de armazón definidas o residuos de aminoácido definidos y que se puedan administrar a un sujeto humano sin el requisito de humanización sustancial, o sin la necesidad de humanización en absoluto. De acuerdo con un aspecto de la invención, los Nanoanticuerpos son polipéptidos que proceden de anticuerpos de cadena pesada y cuyas regiones de armazón y regiones determinantes de la complementariedad son parte de un polipéptido de dominio individual. Ejemplos de dichos anticuerpos de cadena pesada son, pero no se limitan a, las inmunoglobulinas de origen natural desprovistas de cadenas ligeras. Dichas inmunoglobulinas se divulgan en el documento WO9404678 por ejemplo. El sitio de enlace a antígeno de esta clase inusual de anticuerpos de cadena pesada tiene una estructura única que comprende un dominio variable individual. Por motivos de claridad, el dominio variable procedente de un anticuerpo de cadena pesada naturalmente desprovisto de cadena ligera se conoce en el presente documento como un V_HH o dominio V_HH o nanoanticuerpo. Dicho péptido de dominio V_HH puede proceder de anticuerpos producidos en especies de Camelidae, por ejemplo en camello, dromedario, llama, alpaca o guanaco. Otras especies además de Camelidae (por ejemplo, tiburón, pez globo) pueden producir anticuerpos de cadena pesada de unión a antígeno funcionales naturalmente desprovistos de cadena ligera. Los dominios V_HH procedentes de dichos anticuerpos de cadena pesada se encuentran dentro del alcance de la invención. Los anticuerpos de Camelidae expresan un repertorio único, amplio de anticuerpos funcionales de cadena pesada que carecen de cadenas ligeras. Las moléculas de V_HH procedentes de anticuerpos de Camelidae son los dominios de unión a antígeno intactos más pequeños conocidos (aproximadamente 15 kDa, o 10 veces más pequeños que IgG convencional) y además se adaptan bien al suministro a tejidos densos y para acceder al espacio limitado entre macromoléculas. Otros ejemplos de Nanoanticuerpos incluyen los Nanoanticuerpos procedentes de dominios de VH de anticuerpos de cuatro cadenas convencionales que se han modificado por medio de sustitución de uno o más residuos de aminoácidos por residuos específicos de Camelidae (la denominada camelización de los anticuerpos de cadena pesada, documento WO9404678). Preferentemente, dichas posiciones aparecen en la interfaz $VH-VL$ y en los denominados residuos distintivos de Camelidae (documento WO9404678), que comprenden las posiciones 37, 44, 45, 47, 103 y 108. Los nanoanticuerpos corresponde a unidades de reconocimiento pequeñas, robustas y eficaces formadas por medio de un dominio de inmunoglobulina (Ig) individual.

Un fragmento de un anticuerpo, según se usa en el presente documento, se refiere a menos del 100 % de la secuencia (por ejemplo, el 99 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, etc.) pero que comprende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más aminoácidos. Preferentemente un fragmento es de la longitud suficiente como para que la interacción de interés se mantenga con una afinidad de $1 \times$

10⁻⁶ M o mejor. Un fragmento tal y como se usa en el presente documento se refiere a inserciones, eliminaciones y sustituciones opcionales de uno o más aminoácidos que no modifiquen sustancialmente la capacidad de la diana para unirse a un Nanoanticuerpo producido frente a la diana de tipo silvestre. Preferentemente, el número de inserciones eliminaciones o sustituciones de aminoácidos es de hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 o 70 aminoácidos. Una realización de la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende al menos un nanoanticuerpo en el que uno o más residuos de aminoácido se han sustituido sin modificar sustancialmente la capacidad de unión a antígeno.

En una realización particular, el anticuerpo de la invención es bivalente y está formado uniendo conjuntamente, químicamente o por medio de técnicas de ADN recombinante, dos dominios individuales monovalentes de cadenas pesadas. En otra realización particular el anticuerpo de la invención es bi-específico y está formado uniendo conjuntamente dos dominios variables de cadenas pesadas, cada uno con una especificidad diferente (esto es uno con una especificidad para BACE1 y el otro con una especificidad para una neurona tal como por ejemplo ICAM5 o telencefalina). De manera similar, los polipéptidos que comprenden anticuerpos de dominio individual multivalente o multi-específico se incluyen en el presente documento a modo de ejemplos no limitantes.

En todavía otra realización se puede usar como un medicamento un anticuerpo de dominio individual que es capaz de evitar la captación de BACE1. En todavía otra realización, se puede usar como un medicamento un anticuerpo de dominio individual que comprende al menos una de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que comprende SEC ID N.º: 298-37. En otra realización, se puede usar como un medicamento un anticuerpo de dominio individual con un aminoácido que comprende SEC ID N.ºs: 6, 22 o 26.

En todavía otra realización se puede usar un anticuerpo de dominio individual que es capaz de evitar la captación de pro-BACE1 para la fabricación de un medicamento para tratar enfermedades asociadas con una sobre-expresión de BACE1. Un ejemplo de enfermedad donde tiene lugar una sobre-expresión de BACE1 es la enfermedad de Alzheimer. En general, "cantidad terapéuticamente eficaz", "dosis terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" significa la cantidad necesaria para lograr el resultado deseado o resultados deseados (inhibición de unión de BACE1; tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer). Alguien de habilidad normal en la técnica reconocerá que la potencia y por tanto, una "cantidad eficaz" puede variar para el nanoanticuerpo que inhibe la unión de BACE1 usada en la invención. Un experto en la técnica puede evaluar fácilmente la potencia del nanoanticuerpo. Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no resulta biológicamente o de cualquier otro modo indeseable, es decir, se puede administrar el material a un individuo junto con el compuesto sin provocar ningún efecto biológico no deseable o sin que interaccione de manera negativa con ninguno de los otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido.

La expresión "medicamento para tratar" se refiere a una composición que comprende anticuerpos según se describen anteriormente y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable (se pueden usar ambos términos de manera intercambiable) para tratar o evitar enfermedades como se ha descrito en el presente documento. La administración de un nanoanticuerpo como se ha descrito anteriormente o una de sus sales farmacéuticamente aceptables puede ser por administración oral, inhalada o parenteral. En realizaciones particulares, el nanoanticuerpo se administra por medio de administración intratecal o intracerebroventricular. El compuesto activo se puede administrar solo o preferentemente se puede formular como composición farmacéutica. Una cantidad eficaz para tratar la enfermedad de Alzheimer que expresa el antígeno reconocido por el nanoanticuerpo depende de los factores usuales tales como la naturaleza y la gravedad del trastorno que se está tratando y el peso del mamífero. No obstante, una dosis unitaria normalmente estará dentro del intervalo de 0,01 a 50 mg, por ejemplo de 0,01 a 10 mg, o de 0,05 a 2 mg de nanoanticuerpo o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables. Normalmente, las dosificaciones unitarias se administran una vez o más veces al día, por ejemplo, 2, 3 o 4 veces al día, más normalmente de 1 a 3 veces al día, de manera que la dosis diaria total está normalmente dentro del intervalo de 0,0001 a 1 mg/kg; de este modo la dosis diaria total para un adulto de 70 kg es de 0,01 a 50 mg, por ejemplo de 0,01 a 10 mg o más normalmente de 0,05 a 10 mg. Se prefiere en gran medida que el compuesto o su sal farmacéuticamente aceptable se administre en forma de composición de dosis unitaria, tal como una dosis unitaria oral, parenteral o composición inhalada. Tales composiciones se preparan por mezcla y se adaptan de manera apropiada para administración oral, inhalada o parenteral y como tales pueden estar en forma de comprimidos, cápsulas, preparaciones líquidas orales, polvos, gránulos, pastillas, polvos para reconstitución, soluciones inyectables o infundibles o suspensiones o supositorios o aerosoles. Normalmente los comprimidos y cápsulas para administración oral se presentan usualmente en una dosis unitaria y contienen excipientes convencionales tales como agentes de unión, sustancias de relleno, diluyentes, agentes de formación de comprimidos, lubricantes, disgregantes, colorantes, aromatizantes y agentes humectantes. Los comprimidos se pueden revestir de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Sustancias de relleno apropiadas para su uso incluyen celulosa, manitol, lactosa y otros agentes similares. Disgregantes apropiados incluyen almidón, polivinilpirrolidona y derivados de almidón tales como glucolato de almidón de sodio. Lubricantes apropiados incluyen, por ejemplo, estearato de magnesio. Agentes humectantes farmacéuticamente aceptables apropiados incluyen lauril sulfato de sodio. Estas composiciones orales sólidas se pueden preparar por medio de procedimientos convencionales de mezcla, relleno,

formación de comprimidos o similares. Se pueden usar las operaciones de mezcla repetidas para distribuir el agente activo por todas las composiciones empleando grandes cantidades de sustancias de relleno. Dichas operaciones son, por supuesto, convencionales en la técnica. Las preparaciones líquidas orales pueden estar en forma de, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o se pueden presentar como un producto seco para reconstitución con agua u otro vehículo apropiado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, por ejemplo sorbitol, jarabe, metilcelulosa, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio o grasas comestibles hidrogenadas, agentes emulsionantes, por ejemplo lecitina, monooleato de sorbitán, o goma arábiga; vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), por ejemplo, aceite de almendra, aceite de coco separado, ésteres oleosos tales como ésteres de glicerina, propilenglicol o alcohol etílico; conservantes, por ejemplo, p-hidroxibenzoato de metilo o propilo o ácido sórbico y si se desea aromatizantes convencionales o agentes colorantes. Las formulaciones orales también incluyen formulaciones convencionales de liberación prolongada, tales como comprimidos o gránulos que tienen un revestimiento entérico. Preferentemente, las composiciones para inhalación se presentan para administración al tracto respiratorio en forma de una preparación para inhalación o un aerosol o solución para un nebulizador, o en forma de polvo microfino para insuflado, solo o en combinación con un vehículo inerte tal como lactosa. En tal caso las partículas del compuesto activo tienen adecuadamente diámetros de menos de 50 micrómetros, preferentemente menos de 10 micrómetros, por ejemplo entre 1 y 5 micrómetros, tal como entre 2 y 5 micrómetros. Una dosis inhalada favorecida está dentro del intervalo de 0,05 a 2 mg, por ejemplo de 0,05 a 0,5 mg, de 0,1 a 1 mg o de 0,5 a 2 mg. Para administración parenteral, se preparan formas de dosificación unitaria fluidas que contienen un compuesto de la presente invención y un vehículo estéril. El compuesto activo, dependiendo del vehículo y la concentración, puede estar bien suspendido o bien disuelto. Normalmente las soluciones parenterales se preparan disolviendo el compuesto en un vehículo y esterilizando el filtro antes de cargarlo en el interior de un vial o ampolla adecuado y sellando. Ventajosamente, los adyuvantes tales como anestésicos locales, conservantes y agentes tamponadores también se disuelven en el vehículo. Con el fin de mejorar la estabilidad, se puede congelar la composición tras cargar en el vial y se puede retirar el agua al vacío. Se preparan suspensiones parenterales de sustancialmente la misma forma salvo porque se suspende el compuesto en el vehículo en lugar de disolverlo y esterilizarlo por medio de exposición a óxido de etileno antes de la suspensión en el vehículo estéril. Ventajosamente, se incluye un tensioactivo o agente humectante en la composición con el fin de facilitar la distribución uniforme del compuesto activo. Cuando resulta apropiado, se pueden incluir pequeñas cantidades de broncodilatadores, por ejemplo aminas simpatomiméticas, tales como isoprenalina, isoetarina, salbutamol, fenilefrina y efedrina; derivados de xantina tales como teofilina y aminofilina y corticosteroides tales como prednisolona y estimulantes adrenales tales como ACTH. Como resulta una práctica común, normalmente las composiciones vienen acompañadas de direcciones escritas o impresas para su uso en el tratamiento médico de interés.

En otra realización de la invención, se pueden unir uno o más anticuerpos de dominio individual de la invención (opcionalmente por medio de una o más secuencias de engarce apropiadas) a una o más (tal como dos y preferentemente una) secuencias de aminoácidos que permitan que el polipéptido resultante de la invención atraviese la barrera cerebral sanguínea. En particular, dichas una o más secuencias de aminoácidos que permiten a los polipéptidos resultantes de la invención atravesar la barrera cerebral sanguínea pueden ser uno o más (tal como dos y preferentemente uno) nanoanticuerpos, tales como los nanoanticuerpos descritos en el documento WO 02/057445, de los que FC44 (SEC ID N.º: 189 del documento WO 06/040153) y FC5 (SEC ID N.º: 190 del documento WO 06/040154) son ejemplos preferidos.

La presente invención además proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento y/o profilaxis de los trastornos descritos en el presente documento que comprenden una de sus sales farmacéuticamente aceptables, o uno de sus solvatos farmacéuticamente aceptables y si se requiere, uno de sus vehículos farmacéuticamente aceptables.

Debería estar claro que el procedimiento terapéutico de la presente invención para la enfermedad de Alzheimer también se puede usar en combinación con cualquier otra terapia de enfermedad AD conocida en la técnica, tal como inhibidores de gamma-secretasa, otros inhibidores de beta-secretasa.

En una realización particular se pueden usar los anticuerpos de dominio individual de la presente invención para la preparación de un ensayo de diagnóstico. Se puede detectar BACE1 en una variedad de células y tejidos, especialmente en células y tejidos cerebrales, en los que el grado de expresión corrobora la gravedad de la enfermedad de Alzheimer. Por tanto, se proporciona un procedimiento para detectar *in situ* la localización y distribución de la expresión de BACE1 en una muestra biológica. El procedimiento comprende la etapa de hacer reaccionar la muestra biológica con un nanoanticuerpo de BACE1 detectable y detectar la localización y distribución del nanoanticuerpo detectable. La expresión "muestra biológica" se refiere a células y tejidos, incluyendo, pero sin limitarse a células y tejidos cerebrales. La expresión además hace referencia a los fluidos corporales. Por tanto, se proporciona un procedimiento para detectar la proteína BACE1 en un fluido corporal de un paciente. El procedimiento comprende las etapas de hacer reaccionar el fluido corporal con un nanoanticuerpo anti-BACE-1 de la presente invención y monitorizar la reacción. El fluido corporal es, por ejemplo, plasma, orina, fluido cerebroespinal, efusiones de la pleura o saliva. La monitorización de la reacción se puede llevar a cabo teniendo el nanoanticuerpo marcado con un resto detectable, o para usar su región constante como un resto detectable inherente, al que se

puede unir específicamente un segundo anticuerpo que incluye un resto detectable. Por ejemplo se puede detectar CSF BACE1 en pacientes que tienen enfermedad de Alzheimer. De acuerdo con una realización preferida de la presente invención hacer reaccionar el fluido corporal con el nanoanticuerpo anti-BACE1 se lleva a cabo en solución. Alternativamente, la reacción del fluido corporal con el nanoanticuerpo anti-BACE1 se lleva a cabo sobre un sustrato capaz de adsorber proteínas en el fluido corporal, como se conoce bien en la técnica de diagnóstico basada en anticuerpos. Además de acuerdo con la presente invención se proporciona un procedimiento de detectar la presencia, ausencia o nivel de proteína de BACE1 en una muestra biológica. El procedimiento comprende las siguientes etapas. En primer lugar, se extraen las proteínas a partir de la muestra biológica, obteniéndose de este modo una pluralidad de proteínas. El extracto de proteínas puede ser un extracto en bruto y también puede incluir material no proteínico. En segundo lugar, se separan por tamaño las proteínas, por ejemplo, por medio de electroforesis, filtración de gel, etc. En cuarto lugar, se hacen interactuar las proteínas separadas por tamaños con un nanoanticuerpo anti-BACE1. Finalmente, se detecta la presencia, ausencia o nivel de nanoanticuerpo anti-BACE1 que ha interactuado. En caso de electroforesis de gel normalmente la interacción con el anticuerpo se lleva a cabo siguiendo la transferencia de las proteínas separadas por tamaño sobre un soporte sólido (membrana).

Los siguientes ejemplos ilustran de manera más completa las características preferidas de la invención, pero no se pretende que limiten la invención en modo alguno. Todos los materiales de partida y reactivos divulgados a continuación se conocen por los expertos en la técnica y se encuentran disponibles comercialmente o se pueden preparar usando técnicas bien conocidas.

Ejemplos

1. Generación y aislamiento de nanoanticuerpos específicos de BACE1

Generando anticuerpos específicos de BACE1 se inmunizó un dromedario seis veces con BACE1 humano recombinante durante un período de aproximadamente 6 semanas. Tras este período se observó una respuesta humoral específica de BACE1, evaluada por medio de ELISA, para cada una de las 3 subclases de IgG diferentes que existen en Camelidae, a saber las moléculas de IgG1 convencionales y las subclases IgG2 e IgG3 solo de cadena pesada (las clases IgG están revisadas en Conrath y cols., 2003). La cadena variable de los HCAb (V_HH), que contienen el fragmento de unión a antígeno, se amplificó a partir de linfocitos de dromedario aislados y se clonó en el interior de un vector de fagémido pHEN4 generando una biblioteca de 4×10^7 transformantes individuales. Tras rescatar este banco con bacteriófagos coadyuvantes M13K07, se expresó el repertorio V_HH sobre la superficie de los bacteriófagos. Con estos bacteriófagos se pudieron aislar V_HH s específico de BACE1 a partir de la combinación total de V_HH usando inmunopurificación, una técnica de selección *in vitro* (revisada por Smith y Petrenko, 1997). Para esto, se incubaron los bacteriófagos sobre una fase sólida revestida de forma pasiva con el inmunógeno. Tras lavar, se eluyeron los bacteriófagos unidos y se usaron infectando células de *E. coli* TG1 en crecimiento exponencial produciendo nuevos viriones. Se usaron estos viriones en la siguiente ronda de selección con el fin de enriquecer los aglutinantes específicos de BACE1. Tras 2 a 3 rondas consecutivas de inmunopurificación, se seleccionaron las colonias individuales al azar y se incubaron con IPTG induciendo la expresión de los nanoanticuerpos. Se sometieron a extracción los fragmentos proteicos de V_HH a partir del periplasma bacteriano y se sometieron a ensayo individualmente en su capacidad interactuando con BACE1 por ELISA. Se sometieron a secuenciación los clones con puntuación positiva y se identificaron como tales 20 nanoanticuerpos específicos diferentes.

2. Análisis de secuencias de los aglutinantes de BACE-1

Catorce de los veinte aglutinantes de BACE1 seleccionados proceden claramente de genes de línea germinal V_HH : Nb_B1, Nb_B2, Nb_B3, Nb_B5, Nb_B8, Nb_B9, Nb_B10, Nb_B11, Nb_B12, Nb_B15, Nb_B16, Nb_B21, Nb_B25 y Nb_B26, que corresponden a las SEC ID N.^º: 1-14, respectivamente (Figura 1). La secuencia de aminoácidos y su región de armazón-2 (FR2) se parece a la de FR2 V_HH típico (Muyldermans y cols., 1994), con residuos de F/Y, E/Q, R/C y G en las posiciones 37, 44, 45 y 47 respectivamente (numeración de acuerdo con Kabat y cols., 1991). No obstante, parece que los seis fragmentos de anticuerpo que quedan, Nb_B4, Nb_B6, Nb_B7, Nb_B13, Nb_B14 y Nb_B24 (que corresponden con SEC ID N.^º: 38-43, respectivamente) se originaron a partir de genes de línea germinal de anticuerpo convencionales, debido a que contienen la tétrada $V_{37}G_{44}L_{45}W_{47}$, un distintivo típico que distingue el dominio variable de la cadena pesada de los anticuerpos convencionales (V_H) de los fragmentos V_HH a nivel de la línea germinal. Estos residuos distintivos se requieren de forma crítica en los anticuerpos H_2 - L_2 para la asociación de la cadena pesada con una cadena ligera. Debido a la elevada similitud de secuencia de los 6 nanoanticuerpos de tipo V_H , lo más probable es que todos ellos procedan del mismo linaje celular B único. Las diferencias en la secuencia de aminoácidos podrían ser el resultado de la hipermutación somática en curso de los fragmentos génicos de anticuerpos en las células B que maduran y la posterior selección dirigida por antígeno, un proceso continuo que conduce a anticuerpos siempre mejor adecuados. Los 6 nanoanticuerpos de tipo V_H también difieren de los otros aglutinantes porque contienen un residuo de leucina en la posición 11 en su armazón-1 (FR1), otra característica de los genes V_H que es importante para la interacción con una cadena ligera (Lesk y Clothia, 1988, Padlan, 1994). En un FR1 V_HH típico con frecuencia este residuo de Leu está sustituido con un residuo hidrófilo y más pequeño, normalmente una serina, como se observa en los 14 aglutinantes BACE1 con un motivo V_HH real. Todas las moléculas de tipo V_H tienen una CDR3 corta de únicamente 6 aminoácidos, mientras que los otros aglutinantes tienen bucles H3 significativamente más grandes, que varían de 13 a 21 residuos, con una

longitud media de 17. Esto es coherente con la longitud media de V_HH-CDR3 de 15-16 residuos presentada anteriormente en la bibliografía (revisada en Muyldermans y Lauwereys, 1999). En general los CDR2 y CDR1 de V_HHs consisten en 16-17 y 10 residuos respectivamente, pero se comunicó que aproximadamente un 30 % de los ADNc de V_HH de dromedario estaban fuera de tamaño. Esto no afecta negativamente a su función, sino que incluso
5 aumenta el repertorio de unión a antígenos (Nguyen y cols., 2000). También se observan longitudes inusuales de CDR1 y CDR2 para los aglutinantes de BACE1 de los autores de la invención. El CDR2 de Nb_B15 contiene 19 residuos debido a una repetición de tándem de 2 aminoácidos, mientras que el de Nb_B21 consiste en 18 residuos. Se encuentran tamaños aberrantes de CDR1 en Nb_B1, Nb_B15 y Nb_B16, debido a una inserción, una eliminación de 1 aminoácido y una eliminación de 2 residuos, respectivamente. Finalmente, Nb_B25 tiene una región de
10 armazón-3 inusualmente larga con una repetición de tándem de 2 residuos de aminoácido. Las longitudes que se desvían en los aglutinantes BACE1 se deben a cambios ubicados en 3 puntos calientes típicos de inserción/delección de V_HH típicos, que rodean a los residuos 30 ± 3 , 54 ± 3 y 74 ± 1 . Estos puntos calientes se pueden encontrar dentro de o en el borde de secuencias de ADN peculiares, tales como secuencias palindrómicas (que corresponden a los residuos 30-33 y 54-57) o secuencias de tipo heptámero de una señal de recombinación de Ig (con frecuencia encontrada en los residuos 76-78) (Nguyen y cols., 2000). Además del puente disulfuro conservado entre Cys₂₂ y Cys₉₂, no resulta frecuente que aparezcan de residuos cisteína no canónicos extra en los anticuerpos convencionales, aunque no están totalmente excluidos. No obstante, se encuentra un par de cisteínas adicional en el 75 % de los V_HH de dromedario presentados (Arbai Ghahroudi y cols., 1997, Lauwereys y cols., 1998, Conrath y cols., 2001a, Saerens y cols., 2004). Normalmente uno de esos residuos extra de cisteína se encuentra ubicado
20 dentro del bucle de CDR3, mientras que el otro se puede encontrar bien en la posición 30, 32 o bien en la 33, dentro de CDR1 o en la posición 45 en FR2. Debido que el bucle de CDR3 de V_HH se pliega hacia atrás sobre la región CDR1-FR2, los 2 residuos de cisteína se encuentran en distancia de contacto y probablemente se enganchan dando lugar a un enlace disulfuro inter-bucles que reticula los bucles de unión de antígeno (Desmyter y cols., 1996). Dicho enlace reduce la flexibilidad del bucle de CDR3 largo y de este modo, proporciona una mayor estabilidad. Además,
25 el enlace inter-bucles podría conducir a una conformación impedida, pero nueva de los bucles de CDR, aumentando de este modo el repertorio de unión a antígeno.

En comparación con los porcentajes conocidos a partir de la bibliografía, existe una incidencia baja de cisteínas adicionales en los aglutinantes BACE1. Un enlace disulfuro adicional teórico únicamente se encuentra presente en 4
30 de los 14 nanoanticuerpos con resto de V_HH. Nb_B25 tiene un residuo de cisteína en la posición 33 dentro de la CDR1, Nb_B9 tiene uno en la posición 32 y en Nb_B5 se forma probablemente un puente adicional entre Cys₄₅ y el CDR3. Hasta el momento, no se ha descrito cisteína alguna en la posición 53, como se observa en Nb_B12, ni para los V_HH de dromedario ni para los V_HH de llama.

3. Definición de afinidades de los aglutinantes de BACE1 para su inmunógeno a pH 7,0 y pH 5,0

Se subclonaron los ADNc de los 20 aglutinantes de BACE1 aislados en el vector de expresión procariota pHEN6 y se expresaron en células *E. coli* WK6 produciendo proteínas solubles marcadas con His. Posteriormente se purificaron los V_HH recombinantes por cromatografía de afinidad de Ni-NTA, seguida por cromatografía de exclusión
40 por tamaños. Los niveles de expresión de los distintos clones variaron entre 1 y 15 mg por litro de medio de cultivo. Se determinó la afinidad de todos los V_HH por BACE1 de forma cuantitativa usando la tecnología de resonancia de plasmón superficial sobre Biacore 3000.

Se inyectó cada uno de los diferentes V_HH a concentraciones que variaron de 0 a 0,5 μ M sobre un chip sobre el que se había acoplado BACE1. Se evaluó la unión tanto a pH 7,0 como a pH 5,0. Se incluyeron las mediciones a pH 5,0 debido a que a ese valor de pH se debería conservar una interacción firme entre BACE1 y V_HH, ya que se comunicó que el compartimiento endosómico con contenido ligeramente ácido es el sitio subcelular principal de la escisión de sitio- β de APP (Koo, 1994). Además, se observó que BACE1 tenía actividad óptima de secretasa- β a aproximadamente pH 5,0 *in vitro* (Sinha y cols., 1999, Vassar y cols., 1999, Yan y cols., 1999, Lin y cols., 2000). Las
50 constantes de disociación obtenidas para todos los V_HHs pueden variar entre 4 y 669 nM a pH 7,0 y entre 4,2 nM y 6,8 μ M a pH 5,0 (Figura 2A). La mayoría de los aglutinantes tienen constantes de disociación entre 10 y 100 nM en ambas condiciones de pH.

4. Capacidad de los V_HH diferentes extrayendo BACE1 nativo

Para la inmunización del dromedario, el aislamiento de los aglutinantes específicos de BACE1 durante la inmunopurificación y las mediciones de afinidad *in vitro* por medio de Biacore, los autores de la invención usaron BACE1 soluble humano recombinante, completamente desprovisto de cadenas de carbohidrato. Esta proteína recombinante, suministrada por el Dr. S. Masure (Johnson & Johnson, Beerse, Bélgica) se obtuvo a partir de un sistema de expresión celular de insecto usando ADNc de BACE1 ligeramente truncado en el que se retiraron los 4
60 sitios de N-glucosilación y toda la unión de membrana (Bruinzeel y cols., 2002). No resulta impensable que los epítomos que son fácilmente accesibles en BACE1 "desnudo", usados para la inmunización, se encuentren protegidos por cadenas de glucano u otras modificaciones postraduccionales de proteínas BACE1 generadas en células de mamíferos. Por tanto, los autores de la invención se plantean si los aglutinantes seleccionados podrían ser capaces de reconocer BACE1 glucosilado expresado en células de mamíferos.

Sometiendo esto a ensayo, se incubaron 2 µg de moléculas de V_HH marcadas con His con 4 µg de extracto total de proteína de células COS sometidas a transfección de manera transitoria con ADNc de BACE1 humana. Posteriormente se usaron perlas de níquel extrayendo las moléculas de V_HH junto con las proteínas ligadas. Tras lavado abundante se eluyeron las proteínas ligadas, se separaron por medio de SDS-PAGE y se detectó la proteína BACE1 por medio de prueba de bandas de Western usando un anticuerpo específico de BACE1 policlonal de conejo (ProSci, 2253) (Figura 2B). Las proteínas V_HH producidas frente a Ap (Nb_Aβ3) o beta-lactamasa BCII 569/H (Nb_BCIILP) (Conrath y cols., 2001a), se usaron como controles negativos y fueron incapaces de capturar BACE1 procedente de lisado celular, como cabía esperar. Cinco aglutinantes, Nb_B7, Nb_B9, Nb_B10, Nb_B13 y Nb_B24 tienen la eficacia más elevada extrayendo BACE1 en comparación con los otros nanoanticuerpos. Para Nb_B3, Nb_B8, Nb_B12 y Nb_B21, en el mejor de los casos, se puede detectar una traza insignificante de BACE1 coprecipitada tras la exposición durante la noche.

Nótese que en el grupo de los 6 nanoanticuerpos de tipo V_H (Nb_B4, Nb_B6, Nb_B7, Nb_B13, Nb_B14 y Nb_B24) se observan grandes diferencias en la capacidad de cada nanoanticuerpo uniéndose a BACE1 glucosilado, aunque probablemente se hayan originado a partir del mismo linaje de células B. A pesar de una similitud de secuencia global alta de aproximadamente el 90 %, Nb_B13 y Nb_B14 comparten únicamente el 70 % de aminoácidos en sus regiones de CDR de unión a antígenos y esta diferencia aparentemente es suficiente afectando negativamente a la afinidad de Nb_B14 por su antígeno cuando se compara con Nb_B13.

5. Efecto de la expresión ectópica de los nanoanticuerpos de inhibición de BACE

En una etapa siguiente los autores de la invención decidieron expresar algunos de los V_HHs en células de mamíferos. Para ello, se cotransfectaron células COS1-B1, que expresan de forma estable niveles bajos de BACE1, con APP_{Sw} y bien con Nb_B26 o bien con Nb_B9. Se sometieron a transfección células control con vector vacío o con APP_{Sw} solo. Se clonaron los ADNc (de Nb_B26 o Nb_B9) en el interior de un vector de expresión eucariota, aguas abajo del péptido de señal de BACE1 y con una marca de myc-epítipo en su extremo C-terminal (Figura 3A). La secuencia señal garantiza la translocación de la proteína recién formada en el interior de la ruta secretora, donde el V_HH debería encontrar su antígeno, el ectodominio de BACE1. Se cotransfectaron APP_{Sw} y los 2 V_HH en células COS que expresaban de forma estable niveles bajos de BACE1 humano (células COS-B1). Estas células tienen niveles detectables pero no saturados de actividad de secretasa-β y se transfectan fácilmente usando reactivos de transfección basados en liposomas. Dos días después de la transfección, se prepararon extractos celulares, se separaron las proteínas por medio de SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Usando B63.1 policlonal de conejo como anticuerpo primario y GARIR, un anticuerpo secundario acoplado con infrarrojos, se visualizaron los fragmentos con terminación-C de APP y se cuantificaron por medio del Sistema de Formación de Imágenes Infrarrojas de Odyssey (Figura 3B y C). De nuevo, Nb_B26 no tuvo efecto alguno en procesamiento de APP. La proporción de CTF-β en los CTF de APP totales es igual a la de las células no tratadas (Figura 3C). Nb_B9 disminuyó de manera coherente la actividad de secretasa-β en aproximadamente el 30 % (p < 0,001), aunque se expresó a niveles muchos más bajos que Nb_B26 (Figura 3B). Esta disminución tuvo lugar en ausencia de cualquier efecto sobre los niveles de proteína de BACE1, excluyendo la posibilidad de que el nanoanticuerpo afecte a la estabilidad de la proteína BACE1.

6. Efecto de la adición de nanoanticuerpos extracelulares sobre el procesamiento de APP en células

En una etapa posterior se sometió a ensayo si el Nanoanticuerpo Nb_B9 pudo también afectar al procesado de APP cuando se añadió al medio de cultivo de células. Al menos parte de BACE1 está destinado a la membrana de plasma antes de dirigirse a los endosomas, de manera que los anticuerpos específicos BACE1 podrían unirse potencialmente al ectodominio en la superficie celular y podrían introducirse de forma extraordinaria en el interior de las células por medio de co-internalización con su antígeno. Debido a que la escisión de secretasa-β de APP de tipo silvestre tiene lugar predominantemente dentro de los compartimientos endosómicos, la neutralización de la actividad enzimática procedente de la membrana de plasma podría resultar suficiente disminuyendo la proteólisis de APP de sitio-β. Se infectaron células SH-SY5Y, células de neuroblastoma con actividad BACE1 endógena relativamente alta, con adenovirus recombinantes que contenían el ADNc que codificaba bien tipo silvestre de APP humano o bien el mutante APP_{Sw} FAD. Se incluyó el mutante de FAD ya que es un sustrato de BACE1 mucho mejor, lo que permite una detección de Aβ y β-CTF mucho más fácil. No obstante, se ha observado que la mayoría de APP_{Sw} se escinde en el sitio-β en la ruta secretora antes de alcanzar la membrana de plasma (Martin y cols., 1995, Thinakaran y cols., 1996), de manera que la unión de V_HHs que neutralizan BACE1 en la superficie celular podría no ser capaz de evitar la escisión de APP_{Sw} de sitio-β. Dos días después de la infección adenovírica, se marcaron de manera radioactiva las células SH-SY5Y y se incubaron con 2 µM de Nb_B9 durante 6 horas. Se usó el medio acondicionado inmunoprecipitando Ap segregado, mientras se extrajeron la longitud completa de APP y los fragmentos con C-terminales de los lisados celulares. Se separaron todos los fragmentos de APP por medio de SDS-PAGE. Los geles se fijaron, se secaron y se analizaron por medio de formación de imágenes de fósforo. La presencia de Nb_B9 causó un cambio detectable claro en las cantidades de CTF-β o Aβ en comparación con las células no tratadas (Figura 4).

7. Aislamiento de otros nanoanticuerpos específicos de BACE1

Adicionalmente, se llevó a cabo una nueva detección de las librerías de bacteriófagos de V_HH usando una estrategia de inmunopurificación diferente, mientras que se incluyó Nb_B9 para el análisis adicional. Las inmunopurificaciones de bacteriófagos de las dos librerías V_HH se llevaron a cabo usando antígeno biotinilado (el ectodominio de BACE1 humano). Tras tres rondas de inmunopurificación consecutivas, se escogieron al azar 500 colonias individuales para la detección de bacteriófagos por ELISA. 158 de las 500 colonias puntuaron positivo en la detección de bacteriófagos por ELISA. Se evaluaron adicionalmente las colonias positivas por ELISA de extracto periplásmico, 44 colonias de las 158 colonias puntuaron de forma positiva. Se analizaron las colonias positivas aisladas a partir de rastreo por ELISA de extracto periplásmico por PCR y digestión de enzima de restricción agrupándolas de acuerdo con el patrón de restricción y para análisis de secuenciación posterior. Se identificaron 14 nuevos V_HH a partir del rastreo.

La alineación de la secuencia de V_HH se lista en la Figura 5. Entre estos V_HH, se aislaron 10 clones 1B3, 10C2, 12B6, 10B5, 13A5, 2C6, 6A4, 10C4, 13B6 y 1A4 (SEC ID N.^º: 15-24, respectivamente) a partir de las bibliotecas de dromedario y se aislaron 4 clones 2B6, 4A2, 1D4 y 9D3 (SEC ID N.^º: 25-28, respectivamente) a partir de la biblioteca de llama. Se subclonó el ADNc de estos clones en el vector de expresión pHEN6 y posteriormente se purificaron los anticuerpos V_HH para pruebas de ensayos funcionales.

8. Los nanoanticuerpos específicos de BACE1 inhiben la actividad de BACE1 en un ensayo celular y modulan la actividad de BACE1 en el ensayo enzimático carente de células

En primer lugar se sometieron a ensayo todos los 15 V_HHs (14 V_HH nuevos + Nb_B9) en un ensayo celular añadiéndolos al medio de células SH-SY5Y que expresaban de forma estable APPwt a una concentración final de 20 μ M. Como se muestra en la Figura 6, las células tratadas con V_HHs B9, 10C4, 4A2 durante 24 horas estaban mostrando disminuir la generación de sAPP β mientras que el nivel de sAPP α en el medio acondicionado permaneció el mismo que aquel del control, sugiriendo que se inhibió la actividad de BACE1 por estos V_HHs en el ensayo celular.

En paralelo, se sometió a ensayo la capacidad de V_HHs modulando la actividad de β -secretasa en un ensayo de β -secretasa *in vitro* que está basado en la tecnología de Transferencia de Energía de Resonancia y Fluorescencia (FRET). Este ensayo hace uso de un sustrato de péptido sintético que se parece al sitio de escisión de BACE1 de APP y se acopla a un fluoróforo en su extremo N-terminal y un aceptor de fluorescencia en su extremo C-terminal. La luz emitida por el fluoróforo se absorbe por el aceptor de fluorescencia con tal de que estos 2 restos se encuentren en estrecha proximidad. Únicamente tras la proteólisis, cuando se añade BACE1 recombinante al sustrato sintético, ya no tiene lugar más la transferencia de energía y se puede medir la cantidad de luz emitida, que está relacionada linealmente con la cantidad de producto escindido y además con la actividad de β -secretasa. Todos los V_HHs se sometieron a ensayo por medio de este ensayo de FRET de BACE1 a una concentración final de 10 μ M. Como se muestra en la Figura 7, 10C4 y 4A2, los dos inhibidores de BACE1 candidatos identificados en los ensayos celulares, inhibieron la actividad de BACE1 en el ensayo FRET. De manera interesante, B9, el inhibidor candidato aislado a partir del ensayo celular, mostró incrementar el 260 % de la actividad de BACE1 en el ensayo de FRET. Otro clon, 1B3 también mostró incrementar el 125 % de la actividad de BACE1 en el ensayo de FRET, aunque no tuvo efecto aparente sobre BACE1 en el ensayo celular. El resto de V_HH no presentaron ningún efecto o presentaron efectos despreciables sobre la actividad de BACE1 en el ensayo de FRET.

Se establecieron las curvas de dosis-respuesta de 10C4, 4A2 y B9 sobre la actividad de BACE1 por medio de ensayo de FRET. Como se muestra en la Figura 8, 10C4 pudo inhibir un máximo del ~70 % de actividad de BACE1 y la IC_{50} fue de 150 nM. 4A2 pudo inhibir un máximo del ~40 % de actividad de BACE1 y IC_{50} fue de 1,2 μ M. B9 pudo aumentar la actividad de BACE1 hasta 3,5 veces con una concentración de ~100 nM y la IC_{50} en la curva de respuesta fue de 4,1 nM.

Los resultados contradictorios de la B9 que modula la actividad de BACE1 en modos opuestos en el ensayo celular y en el ensayo de FRET implican que B9 podría tener efectos diferentes sobre la escisión de BACE1 de un sustrato grande o de un sustrato pequeño (APP como sustrato celular para BACE1 contiene 695 aminoácidos mientras que el sustrato de péptido en el ensayo FRET contiene únicamente 10 aminoácidos). Por tanto, se sometió a ensayo si B9 podía inhibir la escisión de BACE1 de un sustrato grande en otro ensayo enzimático libre de células MBP-ELISA, que usa la proteína de unión de maltosa conectada a 125 aminoácidos del extremo C-terminal de APPswe (MBP-APPswe-C125) como sustrato de BACE1. Como se muestra en la Figura 9, B9 inhibió la escisión de BACE1 de MBP-APPswe-C125 en una manera dependiente de la dosis y pudo inhibir hasta el 95 % de la actividad de BACE1. Los resultados de este ensayo indican que B9 es un inhibidor de BACE1 cuando se usa un sustrato de péptido grande. De este modo, V_HH Nb_B9, en lugar de ser un aglutinante de sitio activo, fue más probablemente un inhibidor estérico de BACE1. V_HH Nb_B9 pudo unirse a un sitio alostérico sobre BACE1, estimulando de este modo la escisión de BACE1 de pequeños sustratos que pueden todavía alcanzar el sitio de escisión, pero bloqueando el acceso de sustratos grandes, tales como APP a BACE1 por impedimento estérico.

9. Análisis de afinidad de los nanoanticuerpos específicos de BACE1

Se analizaron las afinidades de unión de V_HH B9, 10C4 y 4A2 a un ectodominio de BACE1 humano por medio de Biacore. Como se muestra en la Tabla 2 (izquierda), B9 tuvo la mejor afinidad entre los tres inhibidores de V_HH, con una K_d de 3,67 nM a pH 7,0. 10C4 y 4A2 tuvieron afinidades de 74,7 nM y 48,2 nM respectivamente, que se encuentran todas dentro del intervalo normal de afinidades para los anticuerpos de V_HH.

Adicionalmente, se sometió a ensayo si las afinidades de los V_HH eran estables a pH 4,5, en el que BACE1 tuvo una actividad óptima. Como se muestra en la Tabla 2 (derecha), no hubo cambio significativo en las afinidades de los tres V_HH a pH 4,5 en comparación con el pH neutro, lo que indica que todos los tres V_HH tienen afinidades de unión a BACE1 que fueron estables frente a ácidos.

Tabla 2. Afinidades de V_HH frente a BACE1 humano a pH 7,0 y pH 4,5

	pH 7,0			pH 4,5		
	k _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{off} (s ⁻¹)	K _D (nM)	k _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{off} (s ⁻¹)	K _D (nM)
Nb_B9	2,67E+05	9,80E-04	3,67	6,62E+05	1,30E-03	1,96
Nb_4A2	4,79E+05	2,31E-02	48,2	3,97E+05	8,41E-03	21,2
Nb_10C4	1,06E+05	7,92E-03	74,7	4,51E+05	1,25E-02	27,7

Se investigó la reactividad cruzada de los tres V_HHs con respecto a BACE1 de ratón por anticipado en ensayos de cultivos primarios de neuronas de ratón. Como se muestra en la Tabla 3, tanto en condición de pH neutro como de pH ácido, los tres V_HH reaccionaron de forma cruzada con BACE1 de ratón y sus afinidades con respecto a BACE1 de ratón estuvieron dentro del mismo intervalo de afinidades que las medidas con BACE1 humano.

Tabla 3. Afinidades de V_HH frente a BACE1 de ratón a pH 7,0 y pH 4,5

	pH 7,0			pH 4,5		
	k _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{off} (s ⁻¹)	K _D (nM)	k _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{off} (s ⁻¹)	K _D (nM)
Nb_B9	5,02E+05	8,90E-04	1,77	1,06E+06	1,18E-03	1,11
Nb_4A2	1,65E+05	5,81E-02	35,2	2,51E+05	2,16E-03	8,61
Nb_10C4	1,90E+05	7,97E-03	41,9	9,84E+05	9,88E-03	10

10. Los nanoanticuerpos específicos de BACE1 inhiben la escisión de BACE1 de APPwt en neuronas de ratón en cultivos primarios

Se sometieron a ensayo V_HH Nb_B9 en el ensayo de cultivo celular neuronal (Figuras 10-11). Se transdujeron neuronas sometidas a cultivo primario de ratones de tipo silvestre con APPwt por virus del bosque de Semliki(SFV) y posteriormente se trataron con V_HH Nb_B9 o Nb_A42 purificado añadiendo al medio diluciones seriadas (los V_HH se disolvieron en primer lugar y se diluyeron en PBS). Se marcaron metabólicamente los cultivos neuronales durante 6 horas. Posteriormente se analizaron CTFβ, sAPPβ y Aβ como lectura de la actividad de BACE1. Como se muestra en la Figura 10, Nb_B9 y Nb_4A2 inhibieron la escisión de BACE1 de APP reflejada en la disminución de las señales de Aβ, sAPPβ y CTFβ, mientras que la longitud completa del nivel de APP y sAPPα permaneció en el mismo nivel que el del control. Se estableció la curva de dosis-respuesta de Nb_B9 en el ensayo neuronal (Figura 11) por medio de cuantificación del nivel de CTFβ, que mostró que Nb_B9 inhibió la actividad de BACE1 de manera dependiente de la dosis, con un efecto máximo de inhibición de alrededor del 57 % de la actividad de BACE1 y la IC₅₀ estuvo alrededor de 500 nM.

11. Variación de los nanoanticuerpos inhibidores de BACE1 en el modelo de ratón

Los anticuerpos de dominio individual de camello, los anticuerpos de tamaño mínimo, que tienen propiedades superiores para la expresión intracelular y la función, incluyendo solubilidad, estabilidad y funcionalidad sin el requisito de asociación entre cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos convencionales, son moléculas terapéuticas candidatas para el suministro de genes *in vivo*. Se sometió a ensayo el V_HH Nb_B9 inhibidor de BACE1 en un modelo de ratón transgénico de enfermedad de Alzheimer a través de un suministro génico por mediación de vector vírico. En este experimento se usa un virus adeno-asociado (AAV), uno de los vehículos más eficaces para el suministro génico al sistema nervioso central. Se construyó el ADNc de V_HH Nb_B9, condensado con un péptido señal a partir de BACE1 en su extremo N-terminal y una marca de Myc en su extremo C-terminal, en el interior de un vector AAV. El vector AAV usado aquí contiene un promotor híbrido de citomegalovirus/β-actina de pollo y un elemento regulador pos-transcripcional de marmota, que es una casete optimizada dirigiendo la expresión de proteínas en neuronas (Björklund y cols., 2000).

Para realizar el ensayo *in vivo*, se usan ratones transgénicos APP mutantes Dutch, que sobreexpresan APP humano mutado E693Q sometido al control de un elemento promotor Thy1 específico neuronal (Herzig y cols., 2004). El sitio

de mutación Dutch E693Q en APP humano está 21 residuos de aminoácidos por detrás del sitio de escisión de BACE1, lo que no interfiere con el procesamiento de APP por BACE1. La sobreexpresión de ratón transgénico de APP mutante Dutch genera de forma predominante un péptido A β 40, que se usa como lectura para la actividad de BACE1 en el ensayo in vivo de V_HH Nb_B9. Se usan dos rutas de administración, incluyendo inyección estereotáctica a la región del hipocampo de cerebro de ratón adulto (Fukuchi y cols., 2006) e inyección intracraneal al cerebro del ratón neonato (Levites y cols., 2006) para el suministro de V_HH Nb_B9 envuelto en vector AVV. El GFP envuelto en vector AAVy V_HH Nb_B24 se usan como controles negativos.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Cultivo celular

Se cultivaron células COS, BHK, MEF, CHO, HEK-APPsw, N2A y HeLa a 37 °C en un entorno de CO₂ al 5 % en medio de Eagle modificado de Dulbecco/mezcla de nutrientes F-12 (1:1) (Gibco) suplementado con Suero Bovino Fetal (FBS) (Hyclone) al 10 % (v/v). Las células HEK-APPsw se proporcionaron por el Prof. C. Hass (Adolf Butenandt Institute, Ludwig-Maximilians University, Munich, Alemania). Para las transfecciones transitorias basadas en liposomas, se añadió una mezcla de FuGENE 6 (Roche Applied Science) y ADN plasmídico con una proporción de 3:1 (en μ l y μ g respectivamente) a una placa de cultivo que contenía un de monocapa confluyente de células al 50-80 %, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron las células estables COS-hBACE1 tras la transfección transitoria de células COS con ADNpc3.1zeo-hBACE1 y la selección en 400 μ g/ml de zeocina (Invitrogen). Se sometieron las células SH-SY5Y a proliferación en DMEM GlutaMAX, 4500 mg/l D-glucosa, piruvato de sodio 1 mM (Gibco), suplementado con FBS al 15 % (v/v).

Se aislaron los cultivos neuronales corticales primarios a partir de embriones de ratón E14 (de acuerdo con Goslin y Banker, 1991). Brevemente, se tripsinizaron cortes cerebrales diseccionados con tripsina al 0,25 % en medio HBSS (Gibco), se sedimentaron y se transfirieron a DMEM (Invitrogen, San Diego, CA) suplementado con FBS al 10 % (v/v) y se disociaron haciéndolos pasar a través de pipetas Pasteur de diámetros decrecientes. Se recogieron las células dispersadas por medio de centrifugación y se plaquearon en placas revestidas de poli-L-lisina (Sigma) y se mantuvieron en un medio neurobasal (Gibco) suplementado con L-glutamina (Invitrogen) 0,5 μ M y Suplemento B27 libre de suero (Gibco) al 2 % (v/v). Se añadió arabinósido de citosina (5 μ M) 24 horas después de plaquear evitando la proliferación de células neurogliales.

Marcaje metabólico e inmunoprecipitación de fragmentos de APP

Se lavaron las células en medio carente de Met o carente de Met/Cys (GIBCO) y se marcaron radioactivamente en el medio apropiado que contenía respectivamente ³⁵S Met o ³⁵S Met/Cys de 100 μ Ci (Marcaje Trans ³⁵S, MP Biomedicals, Irvine, CA). En el caso de las incubaciones con FK-506, rapamicina y Nb_B26 (2,1 μ M), se añadieron compuestos al medio marcador. Tras 6 horas de incubación, se recogió el sobrenadante del cultivo como una fuente de A β o sAPP β segregadas y se centrifugó retirando las células desligadas. Se lisaron las células en tampón DIP (Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tritón X-100 al 1 %, desoxicolato de sodio al 1 %, SDS al 1 %), salvo para las células HEK-APP_{sw}, que se lisaron en solución salina tamponada Tris (TBS: NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5), conteniendo Tritón X-100 al 1 % y un cóctel de inhibidores de proteasa (Complete, Roche). Este tampón de lisis permite determinar aún la concentración proteica (Ensayo de Proteínas de Bio-Rad) analizando la eficacia de la interferencia de ARN sobre cantidades iguales de extracto de proteína.

Se precipitaron APP de longitud completa y fragmentos de APP C-terminales a partir de extractos celulares usando anticuerpos de extremos C-terminales de APP B63.1, B11/4 o B12/6 (1:200) y se capturaron inmunocomplejos por medio de proteína G-sefarosa. Para las especies A β , se incubaron las muestras de medio acondicionado con células bien con B7/8 o bien con 4G8 (1:200). Para las neuronas que sobreexpresaban mutantes de BACE1 diferentes, se precipitaron proteínas de BACE1 a partir de los extractos celulares con B45.1.

Se lavaron abundantemente los inmunoprecipitados en tampón DIP, seguido de una etapa de lavado en TBS 1/3, se eluyeron con tampón de muestra de LDS (Invitrogen) suplementado con β -mercaptoetanol al 1 % y se separaron sobre gel NuPAGE al 10 % (Novex) en tampón MES para los fragmentos de APP y MOPS para los mutantes de BACE1. Los geles se fijaron, se secaron y se expusieron rastreo por formación de imágenes de fósforo. Se cuantificó la intensidad de las bandas radioactivas usando Formación de Imágenes de Fósforo (Typhoon, PerkinElmer) y el paquete de soporte lógico ImageQuant.

Detectando las muestras sAPP β , se sometieron muestras de medio acondicionado a SDS-PAGE y prueba de bandas de Western usando un anticuerpo B53/4.

Experimentos de desglucosilación

Se recogieron células en PBS de Dulbecco (GIBCO), se scentrifugaron y se lisaron en tampón de fosfato 100 mM a pH 5,8 para el tratamiento EndoH (46 % de NaH₂PO₄ 0,2 M, 4 % de Na₂HPO₄ 0,2 M y agua al 50 %) y pH 7,4 para

EndoF (9,5 % de NaH_2PO_4 0,2 M, 40,5 % de Na_2HPO_4 0,2 M y agua al 50 %), suplementando con SDS al 0,1 %, Tritón X-100 al 0,5 %, β -mercapto-etanol al 0,5 % e inhibidores de proteasa (Complete, Roche). En primer lugar se desnaturalizaron los lisados calentándolos durante 10 minutos a 70 °C y posteriormente se trataron con EndoH (1 unidad/30 μl , Roche Applied Science) o EndoF (1 unidad/30 μl , Roche, Applied Science) durante 19 horas a 37 °C y se analizaron por medio de SDS-PAGE y prueba de bandas de Western.

Generación de proteínas de fusión GST recombinantes

Se introdujeron plásmidos pGEX-4T-1 (Pharmacia) que codificaban proteínas de fusión GST en células competentes BL21 (Merck Eurolab) y se indujo la expresión de las proteínas GST por medio de β -D-tiogalactopiranosido de isopropilo 0,1 mM (IPTG, Promega). Se liberaron proteínas recombinantes a partir de las bacterias por sonicación en un tampón de Tris-solución salina (NaCl 150 mM, Tris 10 mM) que contenía una mezcla de inhibidor de proteasa (EDTA 1 mM, aprotinina 14 $\mu\text{g/l}$, pepstatina 2 $\mu\text{g/l}$), 100 $\mu\text{g/l}$ de lisoxima, DTT 5 mM y N-laurilsarcosina al 0,5 % (sarcosilo) (Frangioni y Neel, 1993). Tras la centrifugación a 12500 rpm (Beckman J2-21 M/E), retirando los residuos bacterianos insolubles, se añadió Tritón X-100 a una concentración final del 1 % neutralizando los efectos de sarcosilo detergente iónico.

Inmunización de dromedario y llama y análisis de la respuesta inmunológica

Se hicieron la inmunización de dromedario y llama, el aislamiento de los aglutinantes de BACE1 y las mediciones de afinidad en colaboración con el Prof. S. Muyldermans, VUB, Bélgica.

Se inmunizaron una dromedario y una llama con intervalos semanales 6 veces por vía subcutánea con 150 μg de BACE1 humano recombinante puro mezclado con adyuvante GERBU (GERBU Biochemicals). El inmunógeno usado para la inmunización del dromedario se proporcionó por el Dr. S. Masure (Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development, Beerse, Bélgica). Con el fin de obtener grandes cantidades de BACE1 recombinante se infectaron células de insecto con baculovirus que codificaban ectodominio BACE1 (sBACE1) en las que se retiraron los 4 sitios de N-glucosilación teóricos sustituyendo los codones de Asn respectivos por codones de Gln (Bruinzell y cols., 2002). La ausencia de glucosilación se hizo posible produciendo una reserva grande, homogénea de BACE1.

Se inmunizó una llama con una fuente diferente de BACE1. En este caso se purificó el antígeno a partir de células HEK293 que sobreexpresaban BACEs1 (obtenidas a partir de Prof. N. Mertens, Protein Service Facility, VIB, UGent) y de este modo se parecía mucho mejor a la BACE1 nativa, madura y así completamente glucosilada.

Trascurridos cuarenta días tras la primera inyección, se recogió la sangre anticoagulada. Se analizaron las valoraciones de anticuerpos específicos de BACE1 para cada subclase de IgG usando ELISA. En primer lugar se purificaron las 3 subclases de IgG individuales a partir de suero basado en su absorción diferencial de la Proteína A y la Proteína G y las diferentes condiciones de elución (Conrath y cols., 2001a). Se incubó la proteína BACE1 revestida con fase sólida con diluciones seriadas de las diferentes subclases de IgG y posteriormente se detectaron las IgG unidas con un antisuero IgG anti-dromedario de conejo y conjugados de fosfatasa alcalina-IgG anti-conejo (Saerens y cols., 2004).

Construcción de una biblioteca de fragmentos génicos de V_HH

Se aislaron linfocitos periféricos a partir de suero de dromedario/llama (Lyphoprep, Nycomed) y se extrajo el ARN total (de acuerdo con Chomczynski y Sacchi, 1987). Tras RT-PCR con un cebador dN_6 , se usó el ADNc obtenido como plantilla para la amplificación de un fragmento de ADN que abarcaba el dominio variable de IgG hasta el dominio CH2, usando cebadores CALL001 y CALL002 (véase la Tabla 4). Estos cebadores hibridan con la secuencia líder de IgG y el exón CH2 de la cadena pesada de todas las 3 subclases de IgG existentes en dromedario, respectivamente. Usando extracción con gel de agarosa, se separó el fragmento de 600 pb procedente de los anticuerpos únicamente de cadena pesada (V_H -CH2, sin dominio CH1) del fragmento de 900 pb procedente de anticuerpos convencionales (exones V_H -CH1-CH2). Posteriormente se amplificaron los fragmentos génicos de V_HH por PCR sobre el ADN de 600 pb con un par de cebadores anidados, AE6 y FR4FOR (véase la Tabla 4). AE6 se hibrida al armazón-1 de V_HH y contiene un sitio Pst I, mientras que FR4FOR con un sitio Not I es complementario al armazón-4. Se ligaron los diferentes fragmentos V_HH en el interior de un vector de fagémido pHEN4y se transformaron en células *E. coli* TG1 creando una biblioteca de 4×10^7 transformantes. El rastreo por PCR de colonias mostró que aproximadamente el 90 % de las colonias se transformaron con un vector de fagémido que contenía un inserto con el tamaño esperado para un fragmento de V_HH .

Tabla 4: Secuencias de diferentes cebadores usados para la construcción de biblioteca de fragmentos génicos V_HH

Cebador	Secuencia (5' a 3')
CALL001	GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG
CALL002	GGTACGTGCTGTTGAAGTGTCC

AE6	GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGG
FRA4FOR	GGACTAGTGCGGCCGCTGCAGACGGTGACCTGGGT

Selección de fragmentos de V_HH específicos de BACE1

- Se expresó el repertorio de V_HH sobre la superficie de los bacteriófagos tras recuperar la biblioteca con los bacteriófagos coayuvantes M13K07. Se enriquecieron V_HH específicos contra BACE1 por medio de tres rondas consecutivas de selección *in vitro*, una técnica también conocida como inmunopurificación (Smith y Petrenko, 1997). Para esto, se incubaron los V_HHs sobre una fase sólida revestida con antígeno. Se lavaron los bacteriófagos no ligados en PBS más Tween 20 al 0,05 % y se eluyeron los bacteriófagos ligados con trietilamina 100 mM (pH 10,0). Se neutralizaron inmediatamente las partículas de bacteriófagos eluidas con Tris-HCl 1 M (pH 7,5) y se usaron reinfectando exponencialmente células de TG1 de *E. coli* en proliferación. Tras la segunda y tercera rondas de selección se escogieron al azar colonias individuales.

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA)

- Se indujo la expresión del V_HH seleccionado con IPTG 1 mM. Se extrajeron V_HH solubles recombinantes marcados con hemaglutinina (HA) en su extremo C-terminal (el gen que codifica el epítipo de HA se incluye en el vector de fagémido pHEN4) a partir del periplasma por un choque osmótico (Tris-HCl 200 mM pH 8,0, sacarosa 250 mM, EDTA 0,5 mM) (Skerra y Pluckthun, 1988) y se sometieron a ensayo en su capacidad reconociendo su antígeno en los ensayos de ELISA. Se revistieron placas de 96 pocillos de Maxisorb (Nun) durante la noche con proteína BACE1 (100 µl de 1 µg/ml en PBS) a 4 °C. Se bloquearon los sitios de unión residuales durante 2 horas a temperatura ambiente con caseína al 1 % (p/v) disuelta en PBS. Posteriormente se incubó esta fase sólida revestida de antígeno con los diferentes extractos periplásmicos durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar, se incubó sucesivamente la fase sólida con anti-HA de ratón, fosfatasa alcalina-conjugada anti-ratón (Sigma) y 2 mg/ml de fosfato de p-nitrofenilo (Sigma). Se analizaron las señales a 410 nm.

Expresión y purificación de V_HH

- Se subclonaron los genes de V_HH de los clones con puntuación positiva en ELISA en el interior del vector de expresión pHEN6, usando Pst I y BstE II. De este modo, se sustituyó el marcaje de HA-epítipo en el extremo C-terminal de las moléculas de V_HH por una marca de 6 His. Se transformaron las células WK6 de *E. coli* con los plásmidos pHEN6 y se indujo la expresión de las proteínas V_HH recombinantes por medio de IPTG (Saerens y cols., 2004). Se extrajeron moléculas de V_HH a partir de las bacterias usando un choque osmótico (Skerra y Pluckthun, 1988). Posteriormente se capturaron proteínas recombinantes marcadas con His sobre una columna de sefarosa de superflujo de níquel-ácido nitriloacético (Qiagen), se eluyó con un tampón de acetato (pH 4,7) y se purificó de manera adicional por medio de cromatografía de exclusión por tamaños.

Mediciones de BiAcCore

- Se determinaron las constantes cinéticas y la afinidad de las interacciones V_HH-antígeno por medio de una tecnología de resonancia de plasmón superficial sobre un Biacore 3000 (Biacore AB). Se inyectaron moléculas de V_HH purificadas, en un intervalo de concentración de 0-500 nM en Solución Salina Tamponada con Hepes pH 7,0 o tampón de citrato pH 5,0, a 30 µl/min sobre BACE1 (500 unidades de resonancia), se inmovilizaron sobre un chip CM5 (de acuerdo con De Genst y cols., 2005). Se determinaron las constantes cinéticas y de equilibrio (k_{on} , k_{off} y K_D) con el soporte lógico BiAevaluation V3.1. (Biacore AB).

Análisis *in vitro* basados en FRET de actividad de β -secretasa

- Determinando si V_HHs afecta a la actividad de BACE1 los autores de la invención usaron un kit de ensayo *in vitro* por FRET de BACE1 (Panvera P2985). Este ensayo usa un sustrato BACE1 sintético que emite luz tras la escisión. La cantidad de fluorescencia total está relacionada linealmente con la tasa de escisión del sustrato y por tanto con la actividad de β -secretasa. Se incubaron las mezclas de reacción que contenían 20 nM de enzima BACE1 recombinante y 250 nM de sustrato sintético con un exceso de cada V_HH (2,2 µM) o el inhibidor de BACE1 STA-200 (Enzyme System Products, 2,2 µM) en acetato de sodio 50 mM, pH 4,5 a temperatura ambiente, protegido de la luz. Tras 2 horas, se midió la fluorescencia a 595 nm usando contador de multimarcaje VICTOR 1420 (Perkin Elmer Life Sciences). Para cada V_HH, se restó la señal de fondo, emitida por una mezcla que contenía V_HH y sustrato pero no enzima, de la señal medida para la mezcla que contenía V_HH, sustrato y BACE1. Como una fuente alternativa de actividad de β -secretasa, se generaron membranas microsómicas a partir de células HeLa que expresaban, desde el punto de vista ectópico, BACE1 según se describe anteriormente. Se resuspendió la pella microsómica resultante en acetato de sodio 50 mM, pH 4,5. Se mezclaron 50 µg de proteínas microsómicas con 250 mM de sustrato de BACE1 sintético y 2,2 µM de V_HH o STA-200. Se llevaron a cabo la reacción enzimática y el análisis como anteriormente salvo porque las reacciones se mezclaron con cuidado cada 10 minutos durante las 2 horas de incubación.

En otra enfoque, se sintetizó sustrato de péptido FRET MCA-S-E-V-N-L-D-A-E-F-R-K(Dnp)-R-R-R-R-NH₂ por Ana Spec Inc (San José, CA, EE.UU). Se purificó BACE 1 de enzima humana (1-460):IgGfC a partir de células HEK293 de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente (Yang y cols., 204). Para la reacción, se diluyó la enzima en tampón de reacción (acetato de amonio 50 mM, pH 4,6, BSA al 3 %, Tritón X-100 al 0,7 %) a una concentración de 1 µg/ml y se diluyó sustrato en un tampón de reacción a una concentración de 125 µM. Se mezclaron 20 µl de V_HH (diluido en tampón de reacción) con 30 µl de dilución de enzima y 50 µl de dilución de sustrato en placas de poliestireno de 96 pocillos negras (Costar), las placas se leyeron inmediatamente a partir de la señal de línea base con Envision (excitación de 355 nm, emisión de 430 nm, 1 segundo/pocillo), seguido por incubación durante una noche en oscuridad a temperatura ambiente. Se leyeron las placas la mañana siguiente usando el mismo protocolo de lectura, se usó la señal de Fret (señal de línea base) como lectura de la actividad enzimática en cada reacción.

Co-precipitación de BACE1 humano con V_HH marcados con His usando perlas de Ni

Se lisaron células COS que sobreexpresaban BACE1 en PBS que contenía Tritón X-100 al 1 % e inhibidores de proteasa (1 µg/ml de pepstatina, 14 µg/ml de aprotinina, 0,5 mM de pefabloc). Se incubaron 100 µg de este extracto de proteína durante una noche a 4 °C con 2 µg de proteínas de V_HH marcadas con His y perlas de Ni-PDC (Affiland) en tampón de unión (NaCl 342 mM, Na₂HPO₄ 16,2 mM, KCl 6,7 mM, KH₂PO₄ 3,7 mM con Tritón X-100 al 1 %) con los mismos inhibidores de proteasa usados para la lisis celular. Se lavaron los precipitados en tampón de unión suplementado con imidazol 10 mM, reduciendo interacciones no específicas, se eluyeron usando imidazol 300 µM y se redisolviéron por medio de SDS-PAGE. Se visualizó BACE1 por prueba de bandas de Western usando un anticuerpo policlonal anti-BACE1 de conejo (ProSci Inc).

Inmunopurificación de bibliotecas de bacteriófagos con antígeno marcado con biotina

Se llevaron a cabo inmunopurificaciones de biblioteca de bacteriófagos de V_HH con sistema de biotina-estreptavidina. Se etiquetó la proteína de ectodominio BACE1 purificada con Sulfo-NHS-SS-Biotina (Pierce) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se recuperaron las librerías de V_HH con bacteriófago coadyuvante M13K07 generando bacteriófagos. Para la inmunopurificación, se bloquearon 10¹¹ bacteriófagos con BSA al 1 % en 400 µl de tampón de inmunopurificación (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,05 %) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 100 µl de BACE1 biotinilada al bacteriófago hasta una concentración final a 200 nM. Se incubaron el bacteriófago y BACE1 biotinilada durante 1 hora a temperatura ambiente con rotación. Al mismo tiempo se bloquearon 40 µl de estreptavidina inmovilizada (Pierce) en BSA al 1 %. Tras 1 hora de incubación, se añadió estreptavidina inmovilizada pre-bloqueada a la solución de bacteriófago-BACE1 biotinilada y se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente con rotación. Tras la incubación, se centrifugó la estreptavidina inmovilizada a 3000 rpm durante 1 minuto, se descartó el sobrenadante que contenía el bacteriófago no ligado. Se lavó la estreptavidina inmovilizada 5 veces con 1 ml de tampón de inmunopurificación, teniendo cada lavado una duración de 5 minutos con rotación. Tras lavar, se añadió DTT 50 mM a la estreptavidina inmovilizada y se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente con rotación. Se centrifugó la estreptavidina inmovilizada y se usaron los sobrenadantes que contenían bacteriófagos eluidos re-infectando células de *E. coli* TG1 en la siguiente ronda de inmunopurificación de bacteriófagos. Tras tres rondas de inmunopurificación consecutivas, se usaron los bacteriófagos recuperados infectando de *E. coli* TG1 y se plaquearon a una dilución de 10⁻⁴ a 10⁻⁶ y se escogieron colonias individuales para análisis posterior.

Rastreo de bacteriófagos por ELISA

Generando las partículas de bacteriófago con V_HH mostrado en la superficie para la detección por ELISA, se inocularon colonias individuales a partir de inmunopurificación de bacteriófagos en 2 ml de medio TY 2x suplementado con 50 µg/ml de ampicilina y glucosa al 1 % en placas de 24 pocillos a 37 °C durante 8 horas con agitación a 220 rpm. Tras 8 horas de incubación, se añadieron 5 x 10⁸ u.f.c. de bacteriófagos coadyuvantes M13K07 infectando cada uno de los pocillos de bacterias. Se cultivaron las bacterias infectadas a 37 °C durante una noche con agitación a 220 rpm. A la mañana siguiente, se sedimentaron por centrifugación las bacterias a 3000 rpm durante 20 minutos, se transfirieron los sobrenadantes que contenían partículas de bacteriófagos a placas de 24 pocillos. Se añadieron PEG 6000 al 20 %/ NaCl 2,5 M a los sobrenadantes usando 1/6 de volumen precipitando las partículas de bacteriófagos a 4 °C durante 30 minutos. Más tarde se recuperaron las partículas de bacteriófago por centrifugación a 3000 rpm durante 30 minutos y se resuspendieron los sedimentos en 100 µl de PBS.

Para el ensayo de ELISA de las partículas de bacteriófago, se revistió una proteína de ectodominio de BACE1 sobre 48 pocillos de cada placa de microvaloración de 96 pocillos a 100 ng/pocillo a 4 °C durante una noche, se usaron los pocillos no revestidos como control. A la mañana siguiente, se bloquearon las placas de microvaloración con leche al 3 % durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras bloquear, se añadieron 100 µl de partículas de bacteriófagos a cada pocillo revestido y no revestido y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las placas 5 veces con tampón de lavado (PBS, Tween-20 al 0,05 %). Tras lavar, se añadió anticuerpo anti-M13 conjugado de HRP (Amersham) a cada pocillo usando una dilución 1:3000 en leche al 3 % y se incubó durante 1 hora. Posteriormente se lavaron las placas 5 veces con tampón de lavado. Tras lavar, se añadieron 0,02 mg/ml de ATBS de sustrato en desarrollo (Sigma) suplementado con H₂O₂ al 0,3 % (Sigma) a placas de microvaloración y se

incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se leyeron las placas a D.O. 405 nm con un lector de ELISA.

Rastreo de ELISA de extracto periplásmico

- 5 Después de expresarse vector de expresión pHEN4 que contiene una secuencia de señal de PelB (pectato lisasa) antes del ADNc de V_HH, los V_HH se exportan así al espacio periplásmico en sistema bacteriano. Generando el extracto periplásmico que contiene proteínas V_HH para el ensayo de ELISA, se inocularon colonias individuales a partir de inmunopurificación de bacteriófagos en 1 ml de medio caldo Terrific (TB) suplementado con 100 µg/ml de ampicilina en placas de 24 pocillos a 37 °C con agitación a 220 rpm. Cuando D.O. 600 alcanza 0,6, se añadió IPTG
- 10 1 mM al cultivo induciendo la expresión de las proteínas de V_HH. Se incubaron las bacterias adicionalmente durante 15 horas a 28 °C para expresión de las proteínas. Tras la incubación, se recogieron las bacterias por centrifugación a 3000 rpm durante 20 minutos, se disolvieron los sedimentos celulares en solución TES (Tris-HCl 20 mM pH 7,4, EDTA 1 mM, sacarosa 250 mM) y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Se proporcionó el choque osmótico añadiendo volumen 1,5 x de TES/4 a las bacterias y se incubaron en hielo durante 45 minutos. Se recogieron los sobrenadantes que contenían proteínas V_HH por centrifugación a 300 rpm durante 20 minutos y se usaron adicionalmente para ELISA. Los ensayos de ELISA se llevaron a cabo siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente para ELISA de bacteriófagos. Detectando las proteínas de V_HH con un marcaje HA en el extremo C-terminal, se usó anticuerpo monoclonal anti-HA (Amersham) como anticuerpo principal y se usó anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado de fosfatasa alcalina (Amersham) como anticuerpo secundario. Se desarrollaron las placas de
- 20 ELISA con sustrato p-nitrofenil-fosfato (PNPP) (Sigma) y se leyó a D.O. 405 nm con un lector de ELISA.

Preparación y construcción de virus adeno-asociado (AAV)

- 25 Para la generación de AAV, se siguió un procedimiento estándar (Levites y cols., 2006). Brevemente, se construyó el ADNc de V_HH Nb_B9, condensado con un péptido señal a partir de BACE1 en su extremo N-terminal y una marca de Myc en su extremo C-terminal, en el interior de un vector de AAV que contenía un promotor híbrido de citomegalovirus/β-actina de pollo y un elemento regulador postranscripcional de marmota. Se generaron AAV por medio de transfección por plásmido con plásmidos coadyuvantes en células HEK293T. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se recogieron las células y se sometieron a lisis en presencia de deoxicolato de sodio al
- 30 0,5 % y 50 U/ml de Benzonasa (Sigma) por medio de descongelación de la parte congelada y se aisló el virus usando un gradiente discontinuo de iodixanol purificado sobre una columna de HiTrap HQ (Amersham Biosciences). Se determinó la valoración genómica de virus por medio de PCR cuantitativo.

Ratones

- 35 Todos los experimentos con animales estaban en conformidad con los protocolos aprobados por los Comités de Uso y Protección de Animales. Los ratones transgénicos APP mutantes Dutch (C57BL/6J-TgN(Thy-APP_{E693D})) se proporcionaron generosamente por el laboratorio de Mathias Jucker, Universidad de Tubingen, Alemania.

Inyecciones estereotáxicas

- 45 En los primeros experimentos en serie, se administraron directamente vectores de AAV que expresan V_HH Nb_B9 y GFP (control negativo), V_HH Nb_B24 (control negativo) al interior del hipocampo de ratones transgénicos APP mutantes Dutch de 3 meses de vida. Se anestesiaron los ratones con avertina y se colocaron en un aparato estereotáxico. Se inyectaron bilateralmente las preparaciones de AAV (2 µl por sitio) en el interior de la región CA3 del hipocampo (-2,0 mm antero-posterior desde bregma, ± 2,3 mm medio-lateral desde bregma y 1,7 mm por debajo de duramadre). Posteriormente se alojaron los ratones individualmente y se dejaron recuperarse de la cirugía. Sus cerebros se procesaron para análisis 5 semanas después del tratamiento.

Inyecciones neonatales

- 50 El procedimiento se describió anteriormente (Levites y cols., 2006). Brevemente, se crio-anestesiaron crías de 0 días posnatales (P0) en hielo durante 5 minutos. Se inyectaron las preparaciones de AAV (2 µl) intracerebroventricularmente en el interior de ambos hemisferios usando una jeringuilla de Hamilton de 10 ml con una aguja de calibre 30. Posteriormente se colocaron las crías en un lecho de calentamiento con sus materiales de anidamiento originales durante 3-5 minutos y se devolvieron a su madre para posterior recuperación. Sus cerebros se procesaron para análisis 3 meses después de inyección.
- 55

Preparación tisular y análisis bioquímico de Aβ

- 60 Analizando Aβ, se homogeneizaron el hipocampo (a partir de inyecciones estereotáxicas) y los cerebros completos (a partir de inyecciones neonatales) en reactivo de Extracción de Proteína Tisular (Pierce) complementado con un inhibidor de proteasa completo y comprimidos de inhibidor de fosfatasa (Roche Applied Science). Se centrifugaron las muestras homogeneizadas a 4 °C durante 1 hora a 100.000 x g y se usó el sobrenadante para el análisis de
- 65 inmunotransferencia y para las mediciones de ELISA de Aβ usando kits de ELISA (The Genetics Company).

Referencias

- 5 Arbabi Ghahroudi, M., Desmyter, A., Wyns, L., Hamers, R. y Muyldermans, S., 1997. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett.* 414, 521-526.
- 10 Björklund A, Kirik D, Rosenblad C, Georgievska B, Lundberg C, Mandel RJ. 2000. Towards a neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease: use of adenovirus, AAV and lentivirus vectors for gene transfer of GDNF to the nigrostriatal system in the rat Parkinson model. *Brain Res.* 886, 82-98.
- 15 Bruinzeel, W., Yon, J., Giovannelli, S. y Masure, S., 2002. Recombinant insect cell expression and purification of human beta-secretase (BACE-1) for X-ray crystallography. *Protein Expr Purif.* 26, 139-148.
- 20 Chomczynski, P. y Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162, 156-159.
- 25 Conrath, K. E., Lauwereys, M., Galleni, M., Matagne, A., Frere, J. M., Kinne, J., Wyns, L. y Muyldermans, S., 2001a. Beta-lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in the camelidae. *Antimicrob Agents Chemother.* 45, 2807-2812.
- 30 Conrath, K. E., Wernery, U., Muyldermans, S. y Nguyen, V. K., 2003. Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Dev Comp Immunol.* 27, 87-103.
- 35 De Genst, E., Silence, K., Ghahroudi, M. A., Decanniere, K., Loris, R., Kinne, J., Wyns, L. y Muyldermans, S., 2005. Strong in vivo maturation compensates for structurally restricted H3 loops in antibody repertoires. *J Biol Chem.* 280, 14114-14121.
- 40 Desmyter, A., Transue, T. R., Ghahroudi, M. A., Thi, M. H., Poortmans, F., Hamers, R., Muyldermans, S. y Wyns, L., 1996. Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. *Nat Struct Biol.* 3, 803-811.
- 45 Frangioni, J. V. y Neel, B. G., 1993. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal Biochem.* 210, 179-187.
- 50 Fukuchi K, Tahara K, Kim HD, Maxwell JA, Lewis TL, Accavitti-Loper MA, Kim H, Ponnazhagan S, Lalonde R. 2006. Anti-Abeta single-chain antibody delivery via adeno-associated virus for treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 23, 502-11.
- 55 Goslin, K. y Banker, G., 1991. Rat hippocampal neurons in low-density culture. In *Culturing Nerve Cells*. MIT Press, Cambridge, Massachusetts.
- 60 Herzig MC, Winkler DT, Burgermeister P, Pfeifer M, Kohler E, Schmidt SD, Danner S, Abramowski D, Sturchler-Pierrat C, Bürki K, van Duinen SG, Maat-Schieman ML, Staufenbiel M, Mathews PM, Jucker M. 2004. Abeta is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis. *Nat Neurosci.* 7, 954-60.
- 65 Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S. y Foeller, C., 1991. Sequences of proteins of immunological interest. US Public Health Services, NIH, Bethesda, MD.
- 70 Koo, E. H. y Squazzo, S. L., 1994. Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem.* 269, 17386-17389.
- 75 Lauwereys, M., Arbabi Ghahroudi, M., Desmyter, A., Kinne, J., Holzer, W., De Genst, E., Wyns, L. y Muyldermans, S., 1998. Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *Embo J.* 17, 3512-3520.
- 80 Lesk, A. M. y Chothia, C., 1988. Elbow motion in the immunoglobulins involves a molecular ball-and-socket joint. *Nature.* 335, 188-190.
- 85 Levites Y, Jansen K, Smithson LA, Dakin R, Holloway VM, Das P, Golde TE. 2006. Intracranial adeno-associated virus-mediated delivery of anti-pan amyloid beta, amyloid beta40, and amyloid beta42 single-chain variable fragments attenuates plaque pathology in amyloid precursor protein mice. *J Neurosci.* 26, 11923-8.
- 90 Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A. y Tang, J., 2000. Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97, 1456-1460.
- 95 Martin, B. L., Schrader-Fischer, G., Busciglio, J., Duke, M., Paganetti, P. y Yankner, B. A., 1995. Intracellular

accumulation of beta-amyloid in cells expressing the Swedish mutant amyloid precursor protein. *J Biol Chem.* 270, 26727-26730.

- 5 Muyldermans, S., Atarhouch, T., Saldanha, J., Barbosa, J. A. y Hamers, R., 1994. Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng.* 7, 1129-1135.

Muyldermans, S. y Lauwereys, M., 1999. Unique single-domain antigen binding fragments derived from naturally occurring camel heavy-chain antibodies. *J Mol Recognit.* 12, 131-140.

- 10 Nguyen, V. K., Hamers, R., Wyns, L. y Muyldermans, S., 2000. Camel heavy-chain antibodies: diverse germline V(H)H and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. *Embo J.* 19, 921-930.

Padlan, E. A., 1994. Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol.* 31, 169-217.

- 15 Saerens, D., Kinne, J., Bosmans, E., Wernery, U., Muyldermans, S. y Conrath, K., 2004. Single domain antibodies derived from dromedary lymph node and peripheral blood lymphocytes sensing conformational variants of prostate-specific antigen. *J Biol Chem.* 279, 51965-51972.

- 20 Sinha, S., Anderson, J. P., Barbour, R., Basi, G. S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H. F., Frigon, N., Hong, J., Jacobson-Croak, K., Jewett, N., Keim, P., Knops, J., Lieberburg, I., Power, M., Tan, H., Tatsuno, G., Tung, J., Schenk, D., Seubert, P., Suomensaaari, S. M., Wang, S., Walker, D., John, V. y cols., 1999. Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature.* 402, 537-540.

- 25 Skerra, A. y Pluckthun, A., 1988. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science.* 240, 1038-1041.

Smith, G. P. y Petrenko, V. A., 1997. Phage Display. *Chem Rev.* 97, 391-410.

- 30 Thinakaran, G., Teplow, D. B., Siman, R., Greenberg, B. y Sisodia, S. S., 1996. Metabolism of the "Swedish" amyloid precursor protein variant in neuro2a (N2a) cells. Evidence that cleavage at the "beta-secretase" site occurs in the golgi apparatus. *J Biol Chem.* 271, 9390-9397.

- 35 Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G. y Citron, M., 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science.* 286, 735-741.

- 40 Yan, R., Bienkowski, M. J., Shuck, M. E., Miao, H., Tory, M. C., Pauley, A. M., Brashier, J. R., Stratman, N. C., Mathews, W. R., Buhl, A. E., Carter, D. B., Tomasselli, A. G., Parodi, L. A., Heinrikson, R. L. y Gurney, M. E., 1999. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature.* 402, 533-537.

Listado de secuencias

- 45 <110> VIB VZW KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN, K.U.LEUVEN R&D VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL
 <120> Anticuerpos de dominio individual capaces de modular la actividad BACE
 <130> BDS/NAN/V281
 <150> Documento US 61/041.965
 <151> 3-4-2008
 <160> 48
 50 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 126
 <212> PROTEÍNA
 <213> *Camelus dromedarius*
 55 <400> 1

ES 2 447 844 T3

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Trp Thr Tyr Ser Ser Asn
20 25 30

Ser Leu Ser Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu
35 40 45

Gly Val Ala Thr Ile Thr Ser Tyr Val Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp His Ala Lys Ser Thr
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Ile Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Ala Glu Tyr Leu Gly Gly Ser Phe Leu Ser Thr Gly Ala
100 105 110

Tyr Lys Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 2

<211> 127

<212> PROTEÍNA

5 <213> Camelus dromedarius

<400> 2

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Tyr Ser Pro Tyr
20 25 30

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
35 40 45

Ala Ala Ile Arg Lys Gly Ile Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Gln Asp Asp Ala Lys Asn Thr Met Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Val Gly His Tyr Arg Ala Tyr Ala Thr Thr Ser Phe Asp Pro Arg
100 105 110

Arg Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 3

<211> 125

<212> PROTEÍNA

10 <213> Camelus dromedarius

<400> 3

ES 2 447 844 T3

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Thr Tyr Asn Ile Tyr
20 25 30

Thr Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
35 40 45

Ala Gly Ile Tyr Ser Pro Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Ala Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Arg Gly Gly Leu Leu Ser Arg Val Leu Lys Glu Ala Gly Tyr
100 105 110

Asn Ala Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 4

<211> 125

<212> PROTEÍNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 4

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Lys Tyr
20 25 30

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Cys Glu Leu Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ile Ser Gly Gly Val Thr Thr Tyr Ala Ser Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ala Gln Tyr Pro Tyr Ser Ser Ser Trp Pro Arg Cys Pro Phe Arg Ile
100 105 110

Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 5

<211> 123

<212> PROTEÍNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 5

ES 2 447 844 T3

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Arg Ser Gly Gly Thr Val Ser Ile Pro
20 25 30

Tyr Met Ala Trp Phe Arg Gln Gly Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
35 40 45
Ala Ala Ile Tyr Asp Gly Arg Ala Lys Thr Tyr Ala Gly Ser Leu Gln
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Asn Asp Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ala Gly Asn Gly Gly Gly Asn Trp Leu Arg Pro Ser Glu Tyr Asn Tyr
100 105 110

Trp Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6

<211> 121

5 <212> PROTEÍNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 6

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Tyr Thr Tyr Gly Tyr Cys
20 25 30

Ser Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ser Thr Ile Thr Ser Asp Gly Ser Thr Ser Tyr Val Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Lys Tyr Tyr Cys Tyr
85 90 95

Thr Lys Thr Cys Ala Asn Lys Leu Gly Ala Lys Phe Ile Ser Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7

10 <211> 127

<212> PROTEÍNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 7

ES 2 447 844 T3

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Phe Tyr Ser Arg Trp
20 25 30

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Leu Ser Arg Val Pro Gly Phe Phe Pro Leu Phe Pro Ser
100 105 110

Gln Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 8

<211> 129

<212> PROTEÍNA

5 <213> Camelus dromedarius

<400> 8

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Ala Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Val Ser Gly Tyr Thr Tyr Ser Gly Tyr
20 25 30

Phe Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Glu Glu Arg Glu Gly Val
35 40 45

Ala Ala Ile Asp Thr Asn Gly Gly Arg Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser His Asp Asn Ala Glu Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Ala Arg Arg Pro Pro Gly Gly Ser Trp Tyr Pro Pro Pro Leu Arg
100 105 110

Lys Tyr Ser Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 9

<211> 128

<212> PROTEÍNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 9

ES 2 447 844 T3

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Tyr Arg Arg Tyr
20 25 30

Phe Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ala Val
35 40 45

Ala Thr Met Phe Ser Cys Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ala Thr Gln Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Ser Gly Cys Trp Tyr Asp Gly Ser Pro Ala Ala Arg Ser
100 105 110

Val Asp Val Ser Phe Trp Gly His Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 10

<211> 129

<212> PROTEÍNA

5 <213> Camelus dromedarius

<400> 10

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Tyr Ser Tyr Tyr
20 25 30

Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ala
35 40 45

Ala Ile Ala Ile Val Asn Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Gly Asn Asp Lys Asn Thr
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Ala Arg Ser Leu Ser Trp Tyr Ser His Pro Leu Leu Gln
100 105 110

Pro Ser Gln Phe Asn Asn Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 11

10 <211> 128

<212> PROTEÍNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 11

ES 2 447 844 T3

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Glu Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Tyr Thr Tyr Ser Leu Met
20 25 30

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ala Val
35 40 45

Ile Asn Ser Gly Val Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Asn Ala Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Ala
85 90 95

Arg Arg Ser Trp Phe Thr Gly Met Thr Thr Thr Gln Ala Leu Asp Pro
100 105 110
Asp Trp Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 12

<211> 125

<212> PROTEÍNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 12

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Ser Glu Met Asn
20 25 30

Arg Phe Ala Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Arg Glu Val Val
35 40 45

Ala Val Ile Phe Pro Thr Ala Arg Gly Ala Lys Phe Tyr Ser Asp Ser
50 55 60

Val Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Thr Ala Lys Asn Thr Val
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Phe
85 90 95

Cys Ala Ala Ser Ala Asn Ala Met Thr Gly Phe Gln Pro Ser Gly Tyr
100 105 110

Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 13

<211> 129

<212> PROTEÍNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 13

ES 2 447 844 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Thr Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Tyr Arg Ser Tyr
20 25 30

Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Glu Val
35 40 45
Ala Ser Ile Asn Ser Asp Gln Gly Ser Thr Arg Tyr Ala Ala Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ser Ser Gln Asp Asn Ala Asn Asn Thr Val Thr
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Ala Asn Asp Gly Cys Ala Tyr Arg Val Tyr Arg Gly Gly
100 105 110

Ala Tyr Gly Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 14

<211> 129

5 <212> PROTEÍNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 14

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Arg Glu Arg Glu Glu Val
35 40 45

Thr Gly Ile Thr Gln Ile Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Leu Arg Arg Pro Phe Tyr Tyr Pro Leu Leu Glu Arg Pro Ser
100 105 110

Glu Gly Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
115 120 125

<210> 15

<211> 126

<212> PROTEÍNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 15

10

ES 2 447 844 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Tyr Thr Asp Ser Thr Tyr
20 25 30

Tyr Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Gly Gly Val
35 40 45

Ala Thr Leu Ala Ser Arg Tyr Asp Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Arg Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ser Pro Arg Arg Pro Gly Phe Phe Pro Leu Asp Pro Ser Gln
100 105 110

Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 16

<211> 127

<212> PROTEÍNA

5 <213> Camelus dromedarius

<400> 16

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Asp Ile Leu Thr Leu Tyr
20 25 30

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Ser Asp Ile Ile Phe Thr Ser Tyr Ala Asn Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Asp Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Ser Thr Trp Val Pro Gly Phe Phe Pro Leu Phe Ala Ser
100 105 110

Gln Tyr Asn Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 17

10 <211> 127

<212> PROTEÍNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 17

ES 2 447 844 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Asp Ile Leu Thr Leu Tyr
20 25 30

Tyr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Ser Asp Ile Ile Phe Thr Ser Tyr Ala Asn Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Glu Asp Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Ser Thr Trp Val Pro Gly Phe Phe Pro Leu Phe Ala Ser
100 105 110

Gln Tyr Asn Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 18

<211> 125

<212> PROTEÍNA

5 <213> Camelus dromedarius

<400> 18

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala His Ser Asn Thr Tyr Pro Thr Tyr Met
20 25 30

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ala Ala
35 40 45

Ile Tyr Thr Gly Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Ala
85 90 95

Ala Leu Ser Arg Val Pro Gly Phe Phe Pro Leu Phe Pro Ser Gln Tyr
100 105 110

Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 19

<211> 125

<212> PROTEÍNA

10 <213> Camelus dromedarius

<400> 19

ES 2 447 844 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala His Ser Asn Thr Tyr Pro Thr Tyr Met
20 25 30

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val Ala Ala
35 40 45

Ile Tyr Thr Gly Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
65 70 75 80

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Ala
85 90 95

Ala	Leu	Ser	Arg	Val	Pro	Gly	Phe	Phe	Pro	Leu	Phe	Pro	Ser	Gln	Tyr
Asn	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
		115					120					125			

<210> 20

<211> 127

<212> PROTEÍNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 20

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ser Ser Val Tyr
20 25 30

Tyr Ile Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser Gly Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Leu Ser Arg Val Pro Gly Phe Phe Pro Leu Phe Pro Ser
100 105 110

Gln Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 21

<211> 115

<212> PROTEÍNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 21

ES 2 447 844 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gln Ile Asn Ser Gly Gly Gly Thr Thr Tyr Ser Thr Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Asp Ser Thr Gly Ser His Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 22

<211> 124

5 <212> PROTEÍNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 22

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Phe Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Tyr Ser Thr Cys
20 25 30

Ser Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ser Ser Ile Arg Asn Asp Gly Ser Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95

Ile Arg Ile Gly Val Gly Pro Gly Gly Thr Cys Ser Ile Tyr Ala Pro
100 105 110

Tyr Trp Gly Glu Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 23

10 <211> 127

<212> PROTEÍNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 23

ES 2 447 844 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Ser Arg Ser Thr Tyr
20 25 30

Phe Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
35 40 45

Ala Val Ile Asn Tyr Gly Thr Thr Thr Pro Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Ser Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Arg Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Ser Thr Trp Val Pro Gly Phe Phe Pro Leu Phe Ala Ser
100 105 110

Gln Tyr Asn Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 24

<211> 128

<212> PROTEÍNA

5 <213> Camelus dromedarius

<400> 24

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Thr Ala Ser Asp Tyr
20 25 30

Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Gly Gly Met Thr Tyr His Val Asp Ser Val Arg
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Gln Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Ser Cys Ala
85 90 95

Ala Val Ser Cys Ala Gly Ala Trp Phe Ala Asn Arg Ala Leu Arg Glu
100 105 110

Ser Ala Phe Thr Tyr Trp Gly Pro Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 25

<211> 120

<212> PROTEÍNA

<213> Lama glama

<400> 25

10

ES 2 447 844 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Phe Asp Leu Arg
20 25 30

Asp Met Gly Trp Tyr Arg Gln Val Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Thr Ser Gly Gly Thr Ser Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95

Ala Lys Asn Phe Phe Ser Ala Ser Gly Tyr Phe Leu Tyr Trp Gly Lys
100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 26

<211> 121

<212> PROTEÍNA

5 <213> Lama glama

<400> 26

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Glu Thr Gln
20 25 30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Tyr Val
35 40 45

Ser Ser Ile Asn Ser Gly Gly Thr Ile Lys Tyr Tyr Ala Asn Ser Ser
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
85 90 95

Cys Gln Leu Gly Gln Trp Ala Gly Val Gly Ala Ala Ser Ser Arg Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 27

10 <211> 122

<212> PROTEÍNA

<213> Lama glama

<400> 27

ES 2 447 844 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Thr Glu Gly Gly Ser Thr Arg Tyr Ala Gly Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Lys Gly Thr Gly Pro Phe Thr Asp Ile Arg Ser Thr Gly Ser Arg
100 105 110

Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 28

<211> 122

<212> PROTEÍNA

5 <213> Lama glama

<400> 28

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Arg Val
35 40 45

Ser Ala Ile Asn Phe Gly Gly Asp Val Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Lys Gly Leu Ser Pro Tyr Arg Asp Leu Glu Ser Ser Gly Ser Arg
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 29

<211> 10

10 <212> PROTEÍNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 29

Glu Tyr Thr Tyr Gly Tyr Cys Ser Met Gly
1 5 10

<210> 30

15 <211> 16

<212> PROTEÍNA

<213> Camelus dromedarius
 <400> 30
 Thr Ile Thr Ser Asp Gly Ser Thr Ser Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 31
 5 <211> 13
 <212> PROTEÍNA
 <213> Camelus dromedarius
 <400> 31
 Lys Thr Cys Ala Asn Lys Leu Gly Ala Lys Phe Ile Ser
 1 5 10
 10 <210> 32
 <211> 10
 <212> PROTEÍNA
 <213> Camelus dromedarius
 <400> 32
 Gly Tyr Thr Tyr Ser Thr Cys Ser Met Ala
 1 5 10
 15 <210> 33
 <211> 16
 <212> PROTEÍNA
 <213> Camelus dromedarius
 20 <400> 33
 Ser Ile Arg Asn Asp Gly Ser Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 34
 <211> 16
 <212> PROTEÍNA
 25 <213> Camelus dromedarius
 <400> 34
 Arg Ile Gly Val Gly Pro Gly Gly Thr Cys Ser Ile Tyr Ala Pro Tyr
 1 5 10 15
 <210> 35
 <211> 10
 30 <212> PROTEÍNA
 <213> Lama glama
 <400> 35
 Gly Phe Thr Phe Glu Thr Gln Tyr Met Thr
 1 5 10
 <210> 36
 35 <211> 18
 <212> PROTEÍNA
 <213> Lama glama
 <400> 36
 Ser Ile Asn Ser Gly Gly Thr Ile Lys Tyr Tyr Ala Asn Ser Ser Val
 1 5 10 15
 40 Lys Gly
 <210> 37
 <211> 11
 <212> PROTEÍNA
 <213> Lama glama
 45 <400> 37
 Gly Gln Trp Ala Gly Val Gly Ala Ala Ser Ser
 1 5 10
 <210> 38
 <211> 115
 <212> PROTEÍNA
 50 <213> Camelus dromedarius
 <400> 38

ES 2 447 844 T3

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Gly Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gln Ile Asn Ala Arg Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Asp Ser Arg Gly Thr His Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 39

<211> 115

<212> PROTEÍNA

5 <213> Camelus dromedarius

<400> 39

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala Asn Tyr
20 25 30

Trp Leu Tyr Trp Val Arg Asp Ala Pro Gly Lys Gly Ile Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gln Ile Gly Pro Ser Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ala Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Ser Ser Gly Gly Asn Glu Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 40

<211> 115

<212> PROTEÍNA

10 <213> Camelus dromedarius

<400> 40

ES 2 447 844 T3

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gln Val Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu His Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Asp Ser Ser Gly Arg Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 41

<211> 115

<212> PROTEÍNA

5 <213> Camelus dromedarius

<400> 41

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gln Ile Asn Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Ser Ala Gly Gln Gly Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 42

<211> 115

10 <212> PROTEÍNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 42

ES 2 447 844 T3

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gln Ile Asp Gly Gly Gly Arg Lys Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Leu
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Asp Ser Ala Gly Ser His Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 43

<211> 115

5 <212> PROTEÍNA

<213> Camelus dromedarius

<400> 43

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Val Tyr
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gln Ile Asp Ser Gly Gly Tyr Thr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ser Ala Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Asp Ser Ile Gly Ser Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 44

10 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador CALL001

15 <400> 44

gtcctggctg ctctctaca agg 23

<210> 45

```

<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
5  <223> Cebador CALL002
    <400> 45
    ggtacgtgct gttgaactgt tcc      23
    <210> 46
    <211> 29
10  <212> ADN
    <213> Secuencia Artificial
    <220>
    <223> AE6
    <400> 46
15  gatgtgcagc tgcaggagtc tggaggagg      29
    <210> 47
    <211> 35
    <212> ADN
    <213> Secuencia Artificial
20  <220>
    <223> Cebador FR4FOR
    <400> 47
    ggactagtgc ggccgctgca gacggtgacc tgggt      35
    <210> 48
25  <211> 15
    <212> PROTEÍNA
    <213> Secuencia Artificial
    <220>
    <223> Sustrato de péptido FRET
30  <400> 48
    Ser Glu Val Asn Leu Asp Ala Glu Phe Arg Lys Arg Arg Arg Arg
    1          5          10          15

```

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un anticuerpo de dominio individual, desprovisto de una cadena ligera, que se une específicamente a BACE1 que es capaz de inhibir la escisión de proteína precursora de beta amiloide (APP) como se determina en un ensayo celular.
- 2.- El anticuerpo de dominio individual de acuerdo con la reivindicación 1 que procede de camélidos.
- 10 3.- El anticuerpo de dominio individual de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 cuya secuencia de aminoácidos comprende SEC ID N.^º: 6, 22 o 26.
- 4.- El anticuerpo de dominio individual de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para usar como un medicamento.
- 15 5.- El anticuerpo de dominio individual de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para usar en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
- 20 6.- Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de dominio individual de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 7.- El uso de un anticuerpo de dominio individual de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o de la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 para la fabricación de un medicamento para tratar la enfermedad de Alzheimer.
- 25 8.- El uso de un anticuerpo de dominio individual cuya secuencia de aminoácidos comprende SEC ID N.^º: 6, 22 o 26 para la fabricación de un medicamento para tratar la enfermedad de Alzheimer.

Figura 1

	< ---- Armazón-1 ---- >										< - CDR1 - >					< Armazón-2 >					< --- CDR2 --- >				
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	a	b	55	60	65										
Nb_B1	DVQLQESGGGS	SVQAGGSLRL	SCVAS	GWTYSSNSLS	MA	WFRQAPGKERE	GVA	--TI-TSYVGRT	YYADSVKG																
Nb_B2	DVQLQESGGGS	SVQAGGSLRL	SCAVS	GFSYS---	PYYMG	WFRQAPGKERE	GVA	--AI-RKGIGTT	YYADSVKG																
Nb_B3	DVQLQESGGGS	SVQAGGSLRL	SCAVS	GYTYN---	IYTMA	WFRQAPGKERE	GVA	--GIY-SPGGTT	YYADSVKG																
Nb_B5	DVQLQESGGGS	SVQAGGSLRL	SCAAS	GYTFT---	KYPMG	WFRQAPGKERE	CELVS	--SI-IS-GGVT	TYASSVKG																
Nb_B8	DVQLQESGGGS	SVQAGGSLRL	SCARS	GGTVS---	IPYMA	WFRQGP GKERE	GVA	--AIYD-GRAKT	-YAGSLQG																
Nb_B9	DVQLQESGGGS	SVQAGGSLRL	SCAAS	EYTYG---	YCSMG	WYRQAPGKEREL	VS	--TI-TSDGS-T	SYVDSVKG																
Nb_B10	DVQLQESGGGS	SVQPGGSLRL	SCAAS	GYFYS---	RWYMG	WFRQAPGKERE	GVA	--AI-NSGGSI	TSYADSVKG																
Nb_B11	DVQLQESGGGS	SAQAGGSLRL	SCEVS	GYTYS---	GYFMG	WFRQAPGEERE	GVA	--AI-DTNGGRT	WYADSVKG																
Nb_B12	DVQLQESGGGS	SVQAGGSLRL	SCVAS	GFTYR---	RYFMG	WFRQAPGKERE	AVA	--TM-FSCGGT	TYADSVKG																
Nb_B15	DVQLQESGGGS	SVQAGGSLRL	SCAAS	GYSYS---	YYIG	WFRQAPGKERE	GVA	AIAIVNSGGGR	TYADSVKG																
Nb_B16	DVQLQESGGGS	SVQAGGSLRL	SCTAS	GYTYS----	LMG	WFRQAPGKERE	GVA	--VI-NSGVGT	TYADSVKG																
Nb_B21	DVQLQESGGGS	SVQAGGSLRL	SCAAS	GYTSE---	MNRFA	WLRQAPGKDRE	VVA	--VIFPTARGA	KFYSDSVNG																
Nb_B25	QVQLQESGGG	TVQAGGSLRL	SCAAS	GYTYR---	SYCMG	WFRQAPGKERE	EVA	--SI-NSDQG	STRYAASVKG																
Nb_B26	DVQLQESGGGS	SVQAGGSLRL	SCAAS	GYAFS---	SYYMG	WFRQAPGREERE	EVT	--GI-TQIGGT	TYADSVKG																
Nb_B4	DVQLQESGGG	LVQPGGSLRL	SCAAS	EFTFG---	SYWMY	WVRQAPGKGLE	WVA	--QI-NARGST	IYYVDSVKG																
Nb_B6	DVQLQESGGG	LVRPGGSLRL	SCAAS	GFTFA---	NYWLY	WVRDAPGKGLE	WVS	--QI-GPSGR	STYYADAVKG																
Nb_B7	DVQLQESGGG	LVQPGGSLRL	SCAAS	GFAFS---	SYWMY	WVRQAPGKGLE	WVS	--QV-NSDGG	STYYVDSVKG																
Nb_B13	DVQLQESGGG	LVQPGGSLRL	SCAAS	GFTFS---	SYWMY	WVRQAPGKGLE	WVS	--QI-NSSGGT	TYADSVKG																
Nb_B14	DVQLQESGGG	LVQPGGSLRL	SCAAS	GFTFS---	NYWMY	WVRQAPGKGLE	WVS	--QI-DGGGR	KTYADSLKG																
Nb_B24	DVQLQESGGG	LVQPGGSLRL	SCAAS	GFFFS---	VYWMY	WVRQAPGKGLE	WVS	--QI-DSGGY	TTYTDSVKG																

Figura 1 continuación

< ---- Armazón 3 ----					> < --- CDR 3 ---					> Armazón-4				
70	75	80	abc	85	90					105	110			
RFTISRDKAKST--VYLQIDSLKPEDTATYYCAA						EYLGGG-FLSTGA-----YKY				WGQGTQVTVSS		Nb_B1		
RFTFSQDDAKNT--MYLQMNSLKPEDTAIFYCAV						GHYRAYATTSFDPRR-----YDY				WGQGTQVTVSS		Nb_B2		
RFTISQDNAKNT--VYLQMNSLAPEDTAIYYCAA						RGGLLSRVLKEAG-----YNA				WGQGTQVTVSS		Nb_B3		
RFTISRDNAKNT--VYLQMNSLKPEDTAVYYCAA						QYPYSSSWPR---CPFR---IGY				WGQGTQVTVSS		Nb_B5		
RFTISQDNDKNT--LYLQMNSLKPDDTAVYYCAA						GNGGGNWL---RPSE-----YNY				WGKGTQVTVSS		Nb_B8		
RFTISQDNAKNT--VYLQMNSLKPEDTAKYYCYT						KTCA--NK-LGAK-----FIS				WGQGTQVTVSS		Nb_B9		
RFTISQDNAKNT--VYLQMNSLKPEDTAIYYCAA						ALSRVPGFFP---LFPSQ---YNY				WGQGTQVTVSS		Nb_B10		
RFTISHDNAEST--VYLQMNSLQPEDTAIFYCAA						RRPPGGGSWYPPP---LRKYSYNF				WGQGTQVTVSS		Nb_B11		
RETATQDNAKNT--VYLQMNSLKPEDTAIYYCAA						ASGCWYDGSFAA---RSVDVSF				WGHGTQVTVSS		Nb_B12		
RFTISQDNDKNT--VYLQMNSLKPEDTAIYYCAA						RSLSWYSHPL---LQPSQ---FNN				WGQGTQVTVSS		Nb_B15		
RFTISQDNAKST--VYLQMNSLKPEDTAIYYCAA						RRSWFTGMTTQALDPDW---FSY				WGQGTQVTVSS		Nb_B16		
RFTISQDTAKNT--VYLQMNSLEPEDTAMIFYCAA						SANAMTGFQPSG-----YTY				WGQGTQVTVSS		Nb_B21		
RFTSSQDNANNTVTVYLQMNSLKPEDTAIYYCAA						NDGCAYRVYRGGAYG-----YNF				WGQGTQVTVSS		Nb_B25		
RFTISRDNAKNT--VYLQMDSLKPEDTAIYYCAK						LRRPFYYPLLERPSEG---FDY				WGQGTQVTVSS		Nb_B26		
RFTISRDNAKNT--LYLQMNSLKPEDTAVYYCAT						DSRGTH-----				KGQGTQVTVSS		Nb_B4		
RETISRDNARKT--LYLQMNSLKPEDSAVYYCAT						SSGGNE-----				RGQGTQVTVSS		Nb_B6		
RFTISRDNAKNT--LYLHMNSLKPEDTAVYYCAT						DSSGRY-----				RGQGTQVTVSS		Nb_B7		
RFTISRDNAKNT--LYLQMNSLKPEDTAVYYCAT						GSAGQG-----				KGQGTQVTVSS		Nb_B13		
RFTISRDNAKNT--LYLQMNSLKPEDTAMYYCAT						DSAGSH-----				RGQGTQVTVSS		Nb_B14		
RFSASRDNSEKNT--LYLQMNSLKPEDTAVYYCAT						DSIGSN-----				KGQGTQVTVSS		Nb_B24		

Figura 2

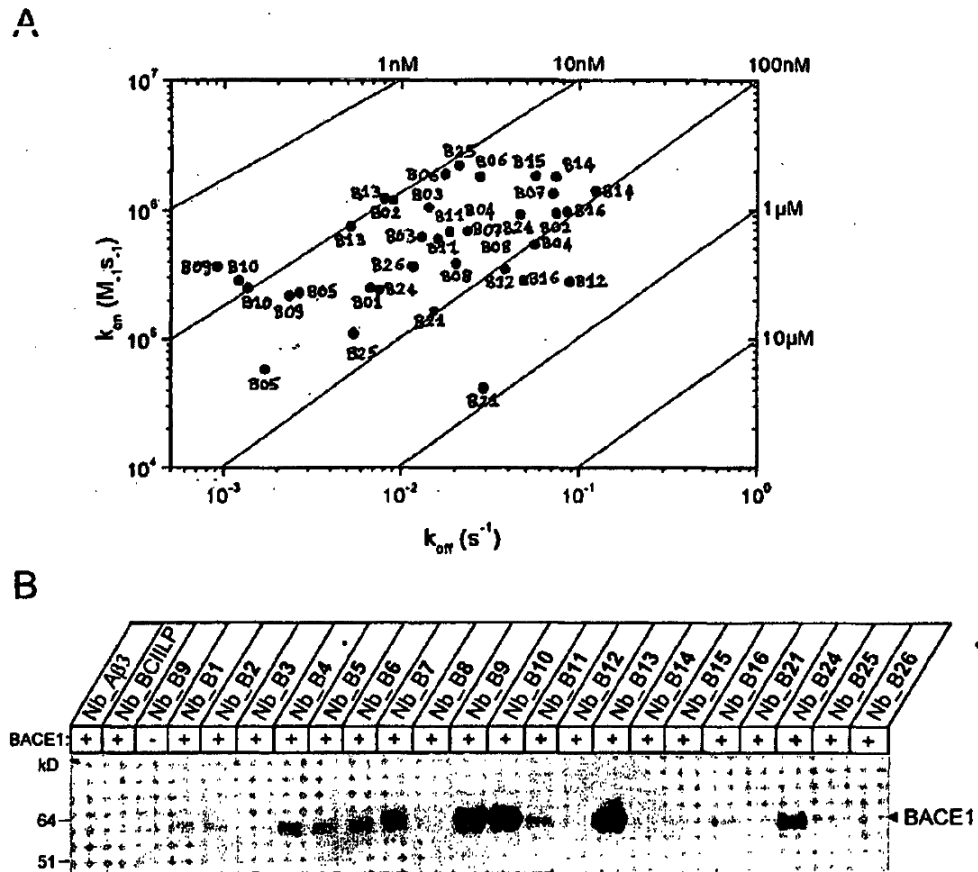
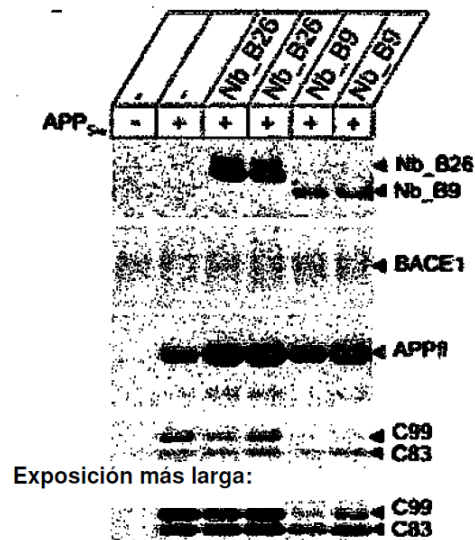


Figura 3

A



B



C

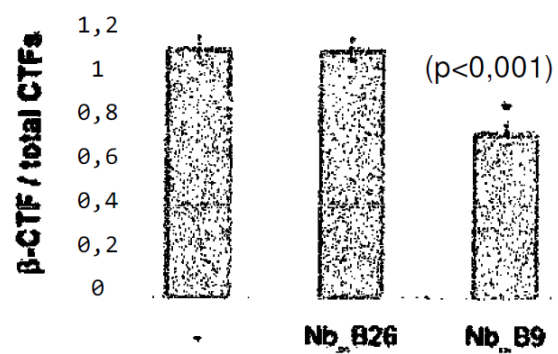


Figura 4

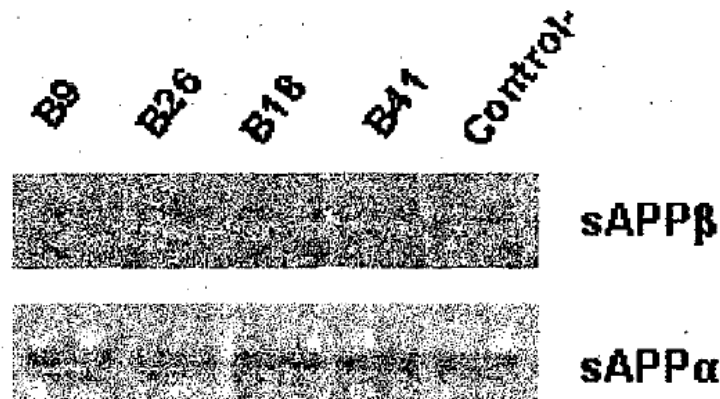


Figura 5

<----- Armazón 1 -----> <- CDR1 -> < Armazón 2 > <----- CDR2 ----->

```

Nb_B9   DVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAAS EYTYGYC-SMG WYRQAPGKERELVS TITSDGS-TS-YVDSVKG
Nb_1B3  QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAAS EYTDSTY-YMA WFRQAPGKEREGVA TLASRYD-TYYADSVKG
Nb_10C2 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAAS RDILTLY-YMG WFRQAPGKEREGVA AISSDII-FTSYANSVKG
Nb_12B6 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAAS RDILTLY-YMG WFRQAPGKEREGVA AISSDII-FTSYANSVKG
Nb_10B5 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAAS ---NTYPTYMG WFRQAPGKEREGVA AIYTG DG-TYYGDSVKG
Nb_13A5 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAAS ---NTYPTYMG WFRQAPGKEREGVA AIYTG DG-TYYGDSVKG
Nb_2C6  QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAAS GFTSSVY-YIS WFRQAPGKEREGVA AINSGGG-ITFYADSVKG
Nb_6A4  QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSNY-WMY WVRQAPGKGLEWVS QINSGGG-TTYSTDSVKG
Nb_10C4 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAAS GYTYSTC-SMA WYRQAPGKERELVS SI--RNDGSTAYADSVKG
Nb_13B6 QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAAS GISRSTY-FMG WFRQAPGKEREGVA VINYGTT-TPYYPDSVKG
Nb_1A4  QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAAS GATASDY-CMG WFRQAPGKEREGVA AI-SRGG-MTYHVDVKG
Nb_2B6  QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS GRIF-DLRDMG WYRQVPGKQRELVA AI-TSGG-TSNYADSVKG
Nb_4A2  QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFETQ-YMT WVRQAPGKGPPEYVS SINSGGTIRYYANSVKG
Nb_1D4  QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSTY-WMY WVRQAPGKGLEWVS AISTEGGS-TRYAGSVKG
Nb_9D3  QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSY-WMY WFRQAPGKGLERVS AINFGGDV-TYYTDSVKG

```

<----- Armazón -2 -----> <----- CDR3 -----> <Armazón 3>

```

RFTISQDNARNTVYLQMNLSLKPEDTARYYCYT KTCANKLGAKFI-----S WGQGTQVTVSS Nb_B9
RFTISQDRAKNTVYLQMNLSLKPEDTGIYYCAA SPRR-PGFFPLDPSQYNY WGQGTQVTVSS Nb_1B3
RFTISRDEKNTVYLQMNLSLKPEDTAIYYCAA ASTWVPGFFFLFASQYNS WGQGTQVTVSS Nb_10C2
RFTISRDEKNTVYLQMNLSLKPEDTAIYYCAA ASTWVPGFFFLFASQYNS WGQGTQVTVSS Nb_12B6
RFTISQDNARNTVYLQMNLSLKPEDTAIYYCAA ALSRVPGFFFLFASQYNY WGQGTQVTVSS Nb_10B5
RFTISQDNARNTVYLQMNLSLKPEDTAIYYCAA ALSRVPGFFFLFASQYNY WGQGTQVTVSS Nb_13A5
RFTISQDNARNTVYLQMNLSLKPEDTAIYYCAA ALSRVPGFFFLFASQYNY WGQGTQVTVSS Nb_2C6
RFTISRDNARNTLYLQMNLSLKPEDTAMYYCAT D-----STGSH RGQGTQVTVSS Nb_6A4
RFTISQDNARNTVYLQMNLSLKPEDTAMYYCNI R-IGVGP-GGTCSIYAPY WEGTQVTVSS Nb_10C4
RFTVSRDSSKNTVYLQMNLSLKPEDTAIYYCAA ASTWVPGFFFLFASQYNS WGQGTQVTVSS Nb_13B6
RFTISRNNARNTVYLQMNLSLKPEDTATYSCAA VSCAGAWFANRALRESAFTY WGPQTQVTVSS Nb_1A4
RFTISRDNARNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNA KNFFSASGYFL-----Y WGKGTQVTVSS Nb_2B6
RFTISRDNARNTLYLQMNLSLKPEDTAIYYCQL GQ-WAGVGAAS-----S RGQGTQVTVSS Nb_4A2
RFTISRDNARNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCSR GTGPFDTIRSTG-----S RRGQTQVTVSS Nb_1D4
RFTISRDNARNTLYLQMNLSLKPEDTAVYYCTK GLSPYRDLESSG-----S RGQGTQVTVSS Nb_9D3

```


Figura 6

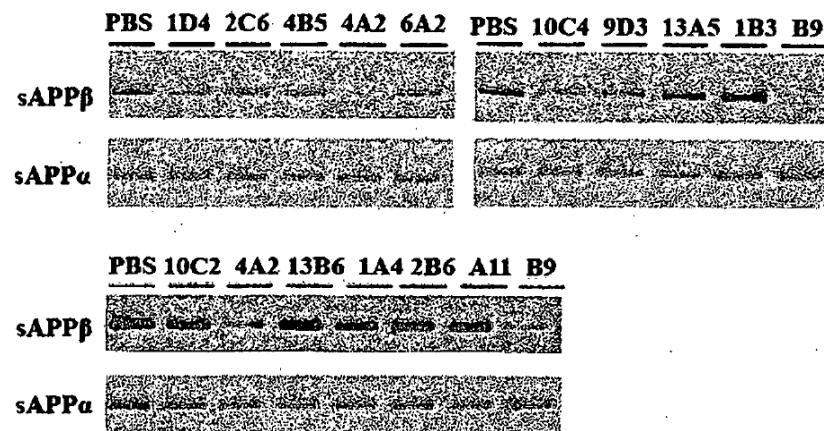


Figura 7

% de Inhibición de actividad de BACE1 en ensayo de Fret

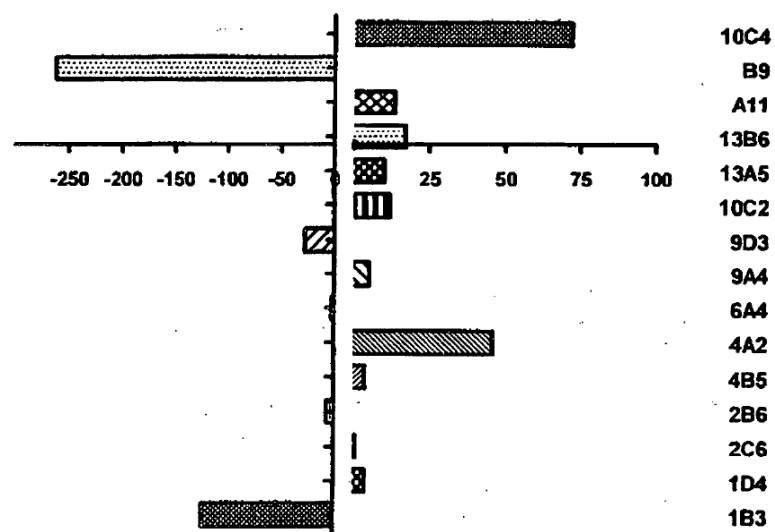


Figura 8

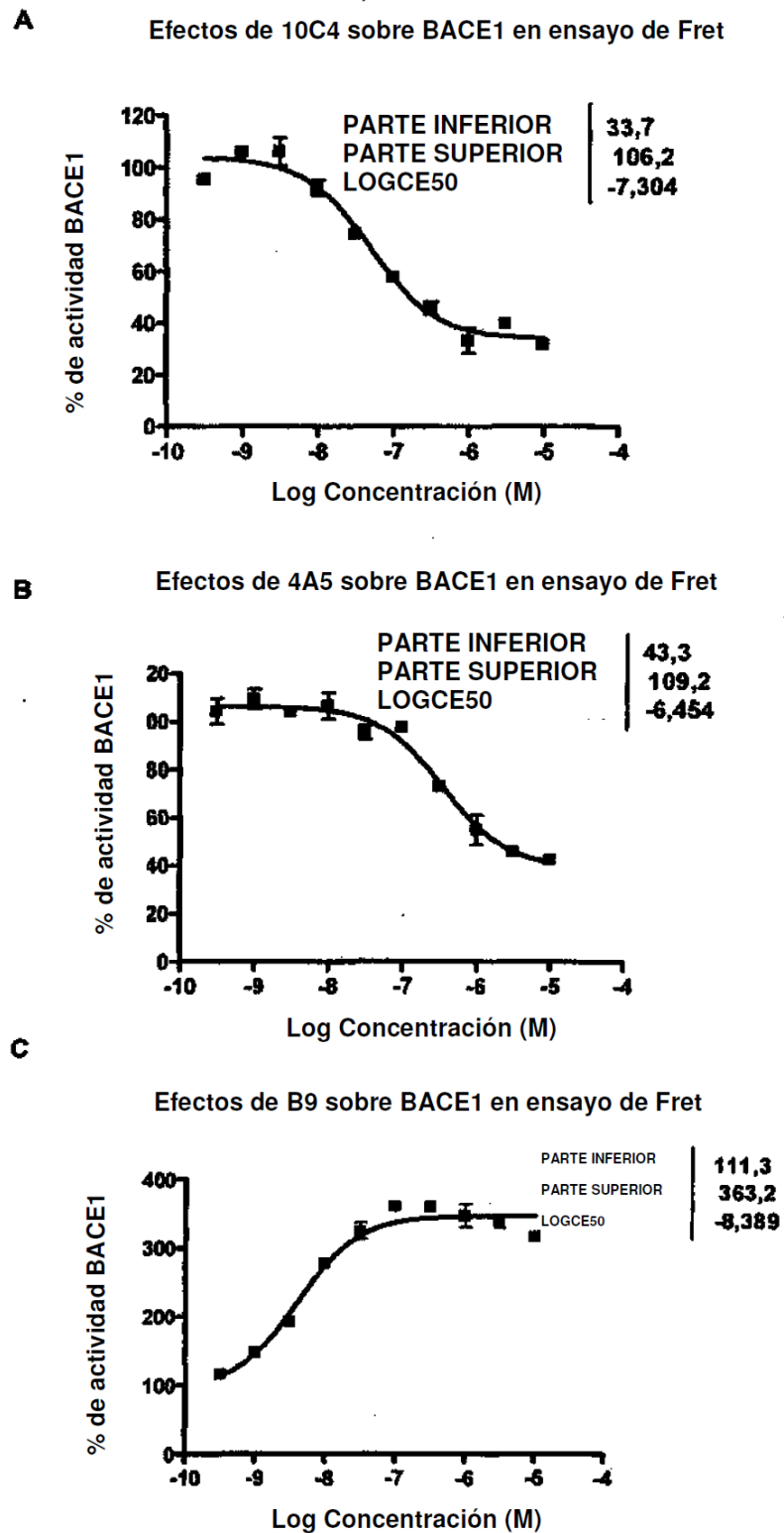


Figura 9

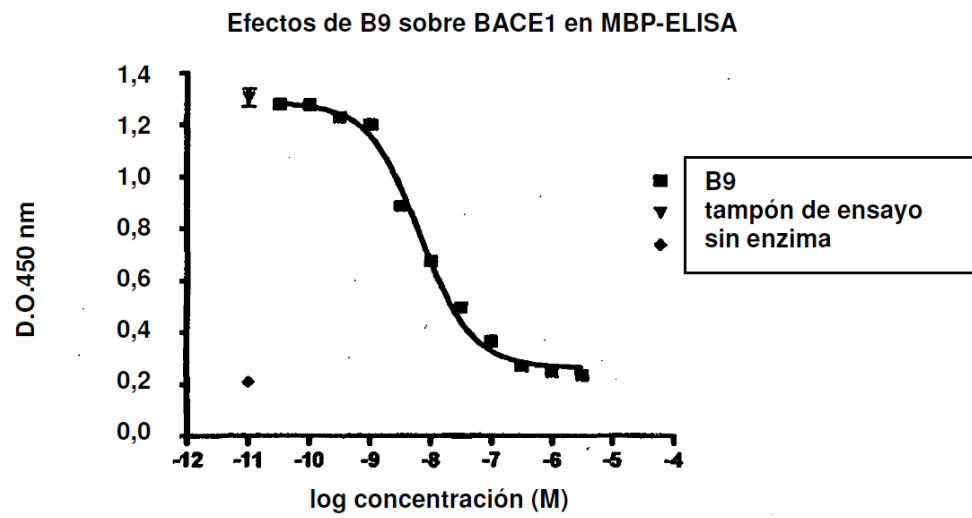


Figura 10

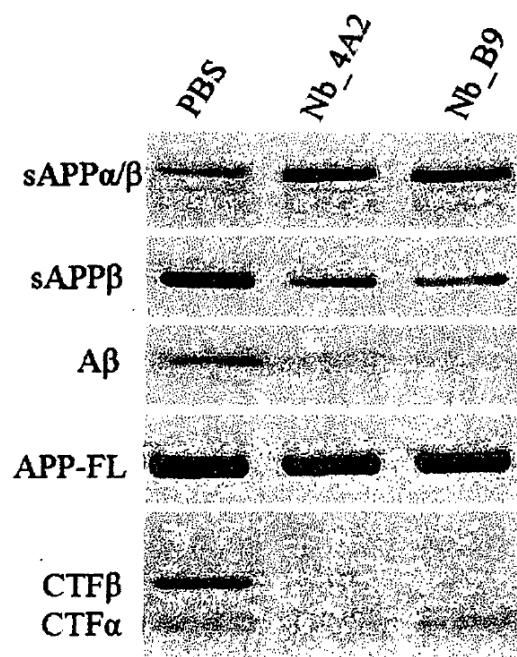
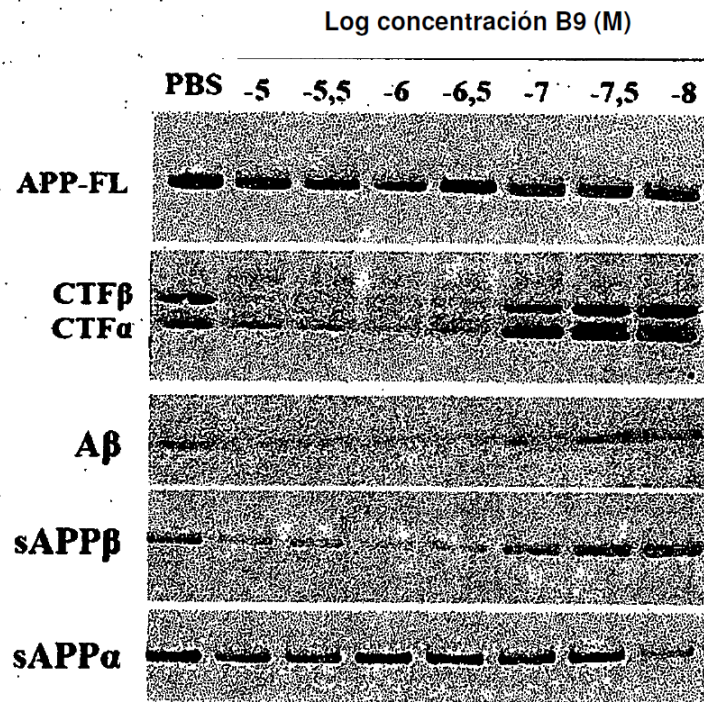


Figura 11



Efectos de B9 sobre la generación de CTFβ

