

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 908 009**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2016 PCT/EP2016/064460**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2016 WO16207240**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2016 E 16733386 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.01.2022 EP 3313879**

54 Título: **Anticuerpos anti-receptor de transferrina con afinidad adaptada**

30 Prioridad:

**24.06.2015 EP 15173508**  
**09.07.2015 EP 15176084**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.04.2022**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)**  
**Grenzacherstrasse 124**  
**4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**DENGL, STEFAN;**  
**GEORGES, GUY;**  
**GOEPFERT, ULRICH;**  
**NIEWOEHNER, JENS y**  
**SCHLOTHAUER, TILMAN**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 908 009 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 anti-receptor de transferrina con afinidad adaptada

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-receptor de transferrina con tasas de disociación diseñadas para el receptor de transferrina humano y su uso como módulo lanzadera a través de la barrera hematoencefálica.

10 **Antecedentes**

La penetración en el cerebro de fármacos para trastornos neurológicos, tales como, por ejemplo, fármacos bioterapéuticos grandes o fármacos de molécula pequeña, que tienen una baja penetración en el cerebro, está estrictamente limitada por la extensa e impermeable barrera hematoencefálica (BHE) conjuntamente con el otro componente celular en la unidad neurovascular (NVU). Se han sometido a prueba muchas estrategias para superar este obstáculo y una es utilizar vías de transcitosis mediadas por receptores endógenos expresados en el endotelio de los capilares cerebrales (receptor de la barrera hematoencefálica). Se han diseñado proteínas recombinantes, tales como anticuerpos monoclonales o péptidos, frente a estos receptores para posibilitar la administración mediada por receptor de productos bioterapéuticos al cerebro. Sin embargo, las estrategias para maximizar la captación cerebral mientras se minimiza la separación errónea dentro de las células endoteliales cerebrales (BEC), y el grado de acumulación dentro de determinados orgánulos (especialmente orgánulos que dan lugar a la degradación del producto bioterapéutico) en las BEC, permanecen sin explorar.

Los anticuerpos monoclonales y otros productos bioterapéuticos tienen un enorme potencial terapéutico para el tratamiento de patologías en el sistema nervioso central (SNC). Sin embargo, se previene su vía hacia el cerebro por la BHE. Los estudios previos han ilustrado que un porcentaje muy pequeño (aproximadamente un 0,1 %) de una IgG inyectada en la circulación sanguínea puede penetrar en el compartimento del SNC (Felgenhauer, Klin. Wschr. 52 (1974) 1158-1164). Esto ciertamente limitará cualquier efecto farmacológico debido a la baja concentración del anticuerpo dentro del SNC.

Se descubrió previamente que se podía mejorar el porcentaje del anticuerpo que se distribuye en el SNC sacando provecho de los receptores de la BHE (es decir, receptor de transferrina, receptor de insulina y similares) (véase, por ejemplo, el documento WO 95/02421).

Por lo tanto, existe una necesidad de obtener sistemas de administración de fármacos para trastornos neurológicos a través de la BHE para transportar eficazmente los fármacos al cerebro.

En el documento WO 2014/033074, se informa de una lanzadera a través de la barrera hematoencefálica.

En el documento WO 2014/189973, se informa de anticuerpos anti-receptor de transferrina y procedimientos de uso. Se informa además de que la selección como diana de un receptor de la BHE con un anticuerpo de alta afinidad específico tradicional, en general, dio como resultado un incremento limitado en el transporte a través de la BHE. Luego, se descubrió que la magnitud de captación y distribución de anticuerpos en el SNC está inversamente relacionada con su afinidad de unión por el receptor de la BHE entre los anticuerpos anti-BHE estudiados. Por ejemplo, un anticuerpo de baja afinidad para el receptor de transferrina (TfR) dosificado a niveles de dosis terapéutica mejora, en gran medida, el transporte a través de la BHE y la retención en el SNC del anticuerpo anti-TfR en relación con un anticuerpo anti-TfR de mayor afinidad, y hace posible alcanzar más fácilmente concentraciones terapéuticas en el SNC (Atwal *et al.*, Sci. Transl. Med. 3 (2011) 84ra43). La prueba de dicho transporte a través de la BHE se logró usando un anticuerpo biespecífico que se une tanto a TfR como a la enzima de escisión de la proteína precursora amiloidea (APP),  $\beta$ -secretasa (BACE1). Una única dosis sistémica del anticuerpo anti-TfR/BACE1 biespecífico genomanipulado usando un anticuerpo de baja afinidad no solo dio como resultado una captación de anticuerpos significativa en el cerebro, sino que también redujo drásticamente los niveles de A $\beta$ 1-40 cerebral en comparación con solo el anti-BACE1 mono-específico, lo que sugiere que la penetración a través de la BHE afecta a la potencia de anti-BACE1 (Atwal *et al.*, Sci. Transl. Med. 3 (2011) 84ra43; Yu *et al.*, Sci. Transl. Med. 3 (2011) 84ra44).

Además, es muy importante una evaluación de la seguridad no clínica exhaustiva de los anticuerpos monoclonales (mAb) destinados a su aplicación terapéutica debido a la creciente complejidad de los aspectos de la genomanipulación de anticuerpos y la variabilidad inducida por la diversidad de sistemas de células de producción recombinantes para la generación de anticuerpos. Además, su estructura compleja, funciones biológicas únicas y las vidas medias más largas de los mAb en comparación con los fármacos de molécula pequeña tradicionales se suman a las consideraciones de seguridad, además de las preocupaciones debido al uso clínico prolongado de los mAb para el tratamiento de enfermedades crónicas (Lynch, C.M., *et al.*, mAbs 1 (2009) 2-11; Kim, S.J., *et al.*, Mol. Cells 20 (2005) 17-29).

El objetivo global de los estudios no clínicos para mAb es definir las propiedades toxicológicas del mAb en cuestión

y proporcionar información para el desarrollo de productos. Los principales objetivos de la evaluación no clínica son (1) la identificación de órganos diana en cuanto a la toxicidad y determinar si la toxicidad es reversible tras el tratamiento, (2) la identificación de una dosis de partida segura para ensayos clínicos de fase I en seres humanos y esquemas de aumento de la dosis posteriores, (3) proporcionar información para supervisar los parámetros de seguridad en los ensayos clínicos y (4) proporcionar datos de seguridad para respaldar las afirmaciones en la etiqueta del producto. Para lograr estos objetivos, se llevan a cabo estudios no clínicos tanto *in vitro* como *in vivo* destinados a definir y entender las propiedades farmacológicas del anticuerpo (Lynch, C.M., *et al.*, mAbs 1 (2009) 2-11; Cavagnaro, J.A., en: Cavagnaro, J.A. (Ed.) "Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals"; Hoboken, NJ: Wiley 2008; 45-65).

Para una satisfactoria evaluación de la seguridad no clínica de un mAb, se deben elegir las especies animales más pertinentes para las pruebas de toxicidad (Lynch, C.M., *et al.*, mAbs 1 (2009) 2-11; Chapman, K., *et al.*, Nat. Rev. Drug Discov. 6 (2007) 120-126). Una especie pertinente es una en la que el anticuerpo sea farmacológicamente activo, el antígeno diana deba estar presente o expresarse y el perfil de reactividad cruzada tisular deba ser similar al de los seres humanos (Lynch, C.M., *et al.*, mAbs 1 (2009) 2-11; Chapman, K., *et al.*, Nat. Rev. Drug Discov. 6 (2007) 120-126; Subramanyam, M. y Mertsching, E., en: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205; Hall, W.C., *et al.*, en: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). Usando ensayos inmunoquímicos o funcionales, se puede identificar una especie animal pertinente que expresa el epítipo deseado y demuestra un perfil de reactividad cruzada tisular similar a los tejidos humanos (Lynch, C.M., *et al.*, mAbs 1 (2009) 2-11; Hall, W.C., *et al.*, en: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). Los estudios de reactividad cruzada entre especies, que son útiles en este procedimiento, implican un estudio inmunohistoquímico de tejidos de una variedad de especies usando micromatrices tisulares de múltiples especies disponibles comercialmente (Lynch, C.M., *et al.*, mAbs 1 (2009) 2-11; Hall, W.C., *et al.*, en: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). De forma alternativa, la evaluación de la unión de anticuerpo a las células de estos animales por separación de células activada por flujo (FACS) típicamente es más sensible que el análisis inmunohistoquímico de cortes de tejido (Lynch, C.M., *et al.*, mAbs 1 (2009) 2-11; Subramanyam, M. y Mertsching, E., en: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205). Las secuencias de ADN y de aminoácidos del antígeno diana se deben comparar entre especies; se debe determinar la homología entre especies (Lynch, C.M., *et al.*, mAbs 1 (2009) 2-11; Subramanyam, M. y Mertsching, E., en: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205).

Además, la biodistribución, función y estructura del antígeno deben ser comparables entre las especies animales pertinentes y los seres humanos para permitir la evaluación de la toxicidad que surge de la unión al anticuerpo del antígeno diana, lo que se denomina toxicidad específica (Lynch, C.M., *et al.*, mAbs 1 (2009) 2-11; 19,20). Además, las fuertes similitudes en la distribución tisular de antígenos diana en las especies animales y seres humanos hacen que sea más probable que los órganos diana de toxicidad identificada en animales predigan las posibles toxicidades en seres humanos. Una carencia de similitud en la distribución tisular de antígenos entre las especies animales y seres humanos no excluye totalmente el uso de las especies animales para estudios de toxicidad, pero estas diferencias se deben tener en consideración para la evaluación del riesgo en seres humanos. En cuanto a la afinidad o densidad antigénica, de forma similar, no se requiere ninguna equivalencia absoluta entre el modelo animal y los seres humanos. La justificación para la pertinencia de las especies seleccionadas para las pruebas de toxicidad se debe incluir en la documentación reglamentaria. Si solo se usa una especie para la evaluación de la seguridad, se justifica un resumen de los experimentos que demuestren la ausencia de especies pertinentes adicionales (Lynch, C.M., *et al.*, mAbs 1 (2009) 2-11).

Si el anticuerpo monoclonal destinado a un uso terapéutico no tiene ninguna reactividad cruzada entre especies, se tiene que usar un anticuerpo sustituto o bien una especie diferente para el modelo. Por tanto, los anticuerpos sustitutos son una solución potencial para las pruebas de seguridad limitadas posibles con anticuerpos monoclonales humanizados con reactividad cruzada entre especies restringida. Sin embargo, actualmente no existen criterios definidos por los que se deba juzgar un posible anticuerpo sustituto antes de su uso para determinar cuestiones de seguridad para el agente clínico (Regulatory Toxicology and Pharmacology, volumen 40, número 3, diciembre de 2004, páginas 219-226).

Por tanto, para identificar un modelo animal para un mAb particular, se tienen que realizar las consideraciones anteriores. Sin embargo, es necesario que el mAb en cuestión tenga una reactividad cruzada con el antígeno diana de la especie de prueba. De otro modo, no se pueden usar ni siquiera las especies de prueba más adecuadas. Por lo tanto, existe la necesidad de obtener mAb que no tengan ninguna reactividad cruzada intraespecie, sino una reactividad cruzada interespecie con su diana en seres humanos y las especies destinadas a ensayos no clínicos.

En el documento EP 2 708 560, se informa de un anticuerpo que reconoce específicamente el receptor de transferrina. En el documento FR 2 953 841, se informa de anticuerpos dirigidos frente al receptor de transferrina y usos de los mismos para la inmunoterapia de tumores dependientes de hierro. En el documento US 2009/162359, se informa de anticuerpos bivalentes y biespecíficos.

Ridgway, J.B., *et al.* informó de la genomanipulación de "botón en ojal" de los dominios CH3 de anticuerpo para la heterodimerización de la cadena pesada (Prot. Eng. 9 (1996) 617-621). Yu Y.

5 Joy *et al.* informaron de una captación cerebral intensificada de un anticuerpo terapéutico al reducir su afinidad por una diana de transcitosis (Sci. Translat. Med. 3 (2011) 1-8).

El documento WO 93/10819 informó del anticuerpo anti-receptor de transferrina humano de ratón 128.1.

## 10 Sumario

La invención se define por las reivindicaciones.

15 Se ha descubierto que se pueden usar los anticuerpos anti-receptor de transferrina como se informa en el presente documento como módulo lanzadera a través de la barrera hematoencefálica para administrar una entidad efectora cerebral al cerebro a través de la barrera hematoencefálica. En determinados modos de realización, el módulo lanzadera a través de la barrera hematoencefálica es una entidad de unión monovalente que se une específicamente al receptor de transferrina. Los anticuerpos anti-receptor de transferrina como se informa en el presente documento, cuando se usan como módulo lanzadera a través de la barrera hematoencefálica, son útiles, por ejemplo, para el diagnóstico o tratamiento de trastornos neurológicos, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer concurrente con enfermedad de Parkinson.

20 En el presente documento, se informa de anticuerpos anti-receptor de transferrina que se unen específicamente al receptor de transferrina humano (huTfR) y al receptor de transferrina de macaco cangrejero (cyTfR). En determinados modos de realización, el anticuerpo anti-receptor de transferrina

- 25 • se une al receptor de transferrina humano (huTfR) y al receptor de transferrina de macaco cangrejero (cyTfR);
- 30 • tiene una tasa de disociación para el receptor de transferrina humano que es igual a o menor que (es decir, como máximo) la del anticuerpo anti-receptor de transferrina 128.1 para el receptor de transferrina de macaco cangrejero, con lo que las tasas de disociación se determinan por resonancia de plasmón superficial, y con lo que el anticuerpo anti-receptor de transferrina 128.1 tiene un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 64 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 65;
- 35 • se une con una tasa de disociación para el receptor de transferrina humano que está entre e incluye 0,1 1/s y 0,005 1/s.

40 En el presente documento se divulga un anticuerpo anti-receptor de transferrina que se une específicamente al receptor de transferrina humano y al receptor de transferrina de macaco cangrejero, que comprende

- 40 i) un dominio variable de la cadena pesada humanizado derivado del dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 01 y
- 45 ii) un dominio variable de la cadena ligera humanizado derivado del dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 26,

50 en el que el anticuerpo tiene una tasa de disociación para el receptor de transferrina humano que es igual a o menor que (es decir, como máximo) la tasa de disociación del anticuerpo anti-receptor de transferrina 128.1 para el receptor de transferrina de macaco cangrejero,

con lo que las tasas de disociación se determinan por resonancia de plasmón superficial, y

55 con lo que el anticuerpo anti-receptor de transferrina 128.1 tiene un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 64 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 65.

Un aspecto de acuerdo con la invención es un anticuerpo humanizado que se une específicamente al receptor de transferrina humano (huTfR) que comprende

- 60 i) una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, y
- ii) un dominio variable de la cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37.

65 En un modo de realización, la tasa de disociación para el receptor de transferrina humano está entre e incluye 0,1 1/s y 0,005 1/s.

En el presente documento se divulga un anticuerpo anti-receptor de transferrina que comprende (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68; (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71, 72 o 73; (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75; (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76; y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78.

Se divulga un anticuerpo anti-receptor de transferrina que comprende (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68; (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72; (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75; (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76; y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78.

En el presente documento se divulga un anticuerpo anti-receptor de transferrina que se une específicamente al receptor de transferrina humano (huTfR) que comprende

i) una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (VH) que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, y

ii) un dominio variable de la cadena ligera (VL) que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37,

en el que el anticuerpo tiene aproximadamente la misma tasa de disociación que un anticuerpo que comprende una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 24 y una secuencia de dominio variable de la cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 37.

En un modo de realización de todos los aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico que tiene al menos una especificidad de unión por el receptor de transferrina y al menos una especificidad de unión por una diana terapéutica. En un modo de realización, el anticuerpo comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une al receptor de transferrina y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a un antígeno cerebral. En otro modo de realización, el antígeno cerebral se selecciona del grupo que consiste en Abeta humano, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), alfa-sinucleína humana, tau humana, que está fosforilada en un residuo de tirosina o serina, CD20 humano, proteína precursora amiloidea (APP) y glucocerebrosidasa humana. En un modo de realización preferente, el anticuerpo multiespecífico se une tanto

i) al receptor de transferrina como a Abeta, o

ii) al receptor de transferrina como a CD20, o

iii) al receptor de transferrina como a alfa-sinucleína, o

iv) al receptor de transferrina como a fosfo-tau, o

v) al receptor de transferrina como a HER2, o

vi) al receptor de transferrina como a glucocerebrosidasa.

En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 formando un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 81 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 82 un sitio de unión para Abeta humano.

En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 formando un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 79 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 80 un sitio de unión para CD20 humano. En un modo de realización, la región variable de la cadena pesada comprende un reemplazo del residuo de aminoácido en la posición 11 de Kabat con cualquier aminoácido excepto leucina. En un modo de realización, la sustitución comprende un reemplazo del residuo de aminoácido en la posición 11 de Kabat con un aminoácido no polar. En un modo de realización preferente, la sustitución comprende un reemplazo del residuo de aminoácido en la posición 11 de Kabat en el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 79 con un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en valina, leucina, isoleucina, serina, y fenilalanina.

5 En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 formando un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 83 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 84 un sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

10 En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 formando un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada humanizado derivado de SEQ ID NO: 85 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado derivado de SEQ ID NO: 86 un sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

15 En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 formando un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada humanizado derivado de SEQ ID NO: 87 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado derivado de SEQ ID NO: 88 un sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

20 En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 formando un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada humanizado derivado de SEQ ID NO: 89 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado derivado de SEQ ID NO: 90 un sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

25 En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 formando un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada humanizado derivado de SEQ ID NO: 91 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado derivado de SEQ ID NO: 92 un sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

30 En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 formando un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada humanizado derivado de SEQ ID NO: 93 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado derivado de SEQ ID NO: 94 un sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

35 En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 formando un sitio de unión para el receptor de transferrina y un sitio de unión para i) glucocerebrosidasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97, o ii) una variante funcional de SEQ ID NO: 97 que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia, o iii) una variante funcional de SEQ ID NO: 97 que tiene una o más mutaciones, deleciones o inserciones aminoacídicas, o iv) una variante funcional truncada de SEQ ID NO: 97 que tiene al menos un residuo de aminoácido en el extremo N o el extremo C o dentro de la secuencia de aminoácidos delecionada, o v) una combinación de iii) y iv).

45 En un modo de realización de todos los aspectos, el anticuerpo comprende

50 i) una región Fc homodimérica de la subclase IgG1 humana opcionalmente con las mutaciones P329G, L234A y L235A, o

ii) una región Fc homodimérica de la subclase IgG4 humana opcionalmente con las mutaciones P329G, S228P y L235E, o

55 iii) una región Fc heterodimérica, en la que

a) un polipéptido de la región Fc comprende la mutación T366W, y el otro polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A e Y407V, o

60 b) un polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366W e Y349C y el otro polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A, Y407V y S354C, o

c) un polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366W y S354C, y el otro polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C,

65 o

iv) una región Fc heterodimérica de la subclase IgG4 humana, en la que ambos polipéptidos de la región Fc comprenden las mutaciones P329G, L234A y L235A y

5 a) un polipéptido de la región Fc comprende la mutación T366W, y el otro polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A e Y407V, o

b) un polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366W e Y349C y el otro polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A, Y407V y S354C, o

10 c) un polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366W y S354C, y el otro polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C,

o

15 v) una región Fc heterodimérica de la subclase IgG4 humana, en la que ambos polipéptidos de la región Fc comprenden las mutaciones P329G, S228P y L235E y

20 a) un polipéptido de la región Fc comprende la mutación T366W, y el otro polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A e Y407V, o

b) un polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366W e Y349C y el otro polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A, Y407V y S354C, o

25 c) un polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366W y S354C, y el otro polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C.

En un modo de realización de todos los aspectos, el anticuerpo es un CrossMab.

En el presente documento se divulga un anticuerpo anti-receptor de transferrina que comprende

30 i) un dominio variable de la cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57 y 58, y un dominio variable de la cadena ligera seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 60, 61, 62 y 63,

35 o

40 ii) un dominio variable de la cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25, y un dominio variable de la cadena ligera seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 y 47.

Un aspecto, como se informa en el presente documento, es una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 Un aspecto, como se informa en el presente documento, es un anticuerpo de acuerdo con la invención para su uso como medicamento.

En el presente documento se divulga el uso de un anticuerpo como se informa en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno neurológico.

50 Un aspecto de la invención es el anticuerpo de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de un trastorno neurológico.

55 En un modo de realización, el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en un trastorno neuropático, una enfermedad neurodegenerativa, cáncer, un trastorno por enfermedad ocular, un trastorno convulsivo, una enfermedad de almacenamiento lisosómico, amiloidosis, una enfermedad vírica o microbiana, isquemia, un trastorno del comportamiento, inflamación del SNC, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, cáncer positivo para CD20 con metástasis cerebrales y cáncer positivo para Her2 con metástasis cerebrales.

60 En el presente documento se divulga el uso de un anticuerpo como se informa en el presente documento en la fabricación de un medicamento para transportar uno o más compuestos a través de la barrera hematoencefálica (BHE).

**Descripción de las figuras**

**Figura 1:** esquema del ensayo de transcitosis

**Figura 2:** tasas de disociación de diferentes anticuerpos anti-receptor de transferrina determinadas a 25 °C usando BIAcore; 1: 128.1; 2: 128.1 fusionado al anticuerpo anti-pTau mAb86; 3: 567; 4: 932; 5: 567 fusionado al anticuerpo anti-pTau mAb86; 6: 1026; 7: 1027; cuadrados: unión al receptor de transferrina de macaco cangrejero; círculo: unión al receptor de transferrina humano; eje y: tasa de disociación [1/s].

**Figura 3:** tasas de disociación de diferentes anticuerpos anti-receptor de transferrina determinadas a 37 °C usando BIAcore; 1: 128.1; 2: 932; 3: 1026; 4: 1027; cuadrados: unión al receptor de transferrina de macaco cangrejero; círculo: unión al receptor de transferrina humano; eje y: tasa de disociación [1/s]

**Descripción detallada de modos de realización de la invención**

En el presente documento se informa una variante humanizada del anticuerpo de conejo 299 que muestra alta transcitosis en un ensayo de transcitosis de acuerdo con el ejemplo 8, que tiene reactividad cruzada con el receptor de transferrina humano y de macaco cangrejero, es decir, se une específicamente a ambos ortólogos del receptor de transferrina, que muestra buena tinción celular y que tiene una semivida similar (reflejada por la tasa de disociación) que el anticuerpo murino 128.1 para el receptor de transferrina de macaco cangrejero para el receptor de transferrina humano.

Un aspecto de la invención es un anticuerpo humanizado que se une específicamente al receptor de transferrina humano que comprende un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37.

En un modo de realización, el anticuerpo humanizado es inactivo tiene su función efectora inactiva.

En un modo de realización, el anticuerpo humanizado se une específicamente al receptor de transferrina humano y al receptor de transferrina de macaco cangrejero.

En un modo de realización, el anticuerpo humanizado es

- a) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG1, o
- b) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG4, o
- c) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG1 con las mutaciones L234A, L235A y P329G,
- d) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG4 con las mutaciones S228P, L235E y opcionalmente P329G,
- e) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG1 con las mutaciones L234A, L235A y P329G en ambas cadenas pesadas y las mutaciones T366W y S354C en una cadena pesada y las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C en la otra cadena pesada respectiva, o
- f) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG4 con las mutaciones S228P, L235E y opcionalmente P329G en ambas cadenas pesadas y las mutaciones T366W y S354C en una cadena pesada y las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C en la otra cadena pesada respectiva.

Un aspecto de la invención es un anticuerpo biespecífico que comprende

i) un primer sitio de unión que comprende un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37,

y

ii) un segundo sitio de unión seleccionado de

a) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 81 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 82, o

b) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 83 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 84, o

c) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 85 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 86, o



d) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 87 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 88, o

5 e) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 91 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 92, o

f) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 89 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 90, o

10 g) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 93 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 94, o

15 h) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 79 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 80.

Un aspecto de la invención es una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo de la invención y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 Un aspecto de la invención es un anticuerpo de la invención para su uso como medicamento.

Un aspecto de la invención es un anticuerpo de la invención para su uso en el tratamiento de un trastorno neurológico.

25 Un aspecto de la invención es el uso de un anticuerpo de la invención en la fabricación de un medicamento.

En el presente documento se divulga un procedimiento de tratamiento que comprende administrar un anticuerpo como se informa en el presente documento para tratar un trastorno neurológico.

### 30 I. Definiciones

Una "región estructural humana aceptora" para los propósitos en el presente documento es una región estructural que comprende la secuencia de aminoácidos de una región estructural del dominio variable de la cadena ligera (VL) o una región estructural del dominio variable de la cadena pesada (VH) derivada de una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana, como se define a continuación. Una región estructural humana aceptora "derivada de" una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunos modos de realización, el número de cambios aminoacídicos es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos. En algunos modos de realización, la región estructural humana aceptora del VL es idéntica en secuencia a la secuencia de la región estructural de inmunoglobulina humana del VL o secuencia de la región estructural consenso humana.

45 "Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y se puede representar, en general, por la constante de disociación (Kd). Se puede medir la afinidad por procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los modos de realización ilustrativos y ejemplares específicos para medir la afinidad de unión se describen en lo que sigue.

50 Un anticuerpo "madurado en afinidad" se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVR), en comparación con un anticuerpo original que no posee dichas alteraciones, dando como resultado dichas alteraciones una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

55 Se usa el término "anticuerpo" en el presente documento en el sentido más amplio y engloba diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada.

60 Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv) y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

El término anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que una porción de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie diferente.

5

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , y  $\mu$ , respectivamente.

10

Las "funciones efectoras" se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con la clase de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor de Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, el receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

15

Una "cantidad eficaz" de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

20

El término "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región de extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. En un modo de realización, una región Fc con las cadenas pesadas de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxílico de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C terminal (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de los residuos de aminoácido en la región Fc o región constante es de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, como se describe en Kabat, E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.<sup>a</sup> ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242.

25

30

"Región estructural" o "FR" se refiere a los residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable consiste, en general, en cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR aparecen, en general, en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

35

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo natural o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento.

40

Los términos "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas" que incluyen la célula transformada primaria y la descendencia derivada de la misma independientemente del número de pases. La descendencia puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula original, sino que puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la que se criba o selecciona en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento.

45

50

Una "región estructural consenso humana" es una región estructural que representa los residuos de aminoácido que aparecen lo más comúnmente en una selección de secuencias de la región estructural del VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias del VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias del dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat, E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.<sup>a</sup> ed., Bethesda MD (1991), NIH Publication 91-3242, vols. 1-3. En un modo de realización, para el VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat *et al.*, *supra*. En un modo de realización, para el VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat *et al.*, *supra*.

55

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácido de HVR no humanas y residuos de aminoácido de FR humanas. En determinados modos de realización, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización.

60

65

El término "región hipervariable" o "HVR" como se usa en el presente documento se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia ("regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR") y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables") y/o contienen los residuos en contacto con el antígeno ("contactos con el antígeno"). En general, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3).

Las HVR en el presente documento incluyen

- (a) los bucles hipervariables que se producen en los residuos de aminoácido 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia, C. y Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917);
- (b) las CDR que se producen en los residuos de aminoácido 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) (Kabat, E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.<sup>a</sup> ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242);
- (c) los contactos con el antígeno que se producen en los residuos de aminoácido 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2), y 93-101 (H3) (MacCallum *et al.* J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)); y
- (d) combinaciones de (a), (b) y/o (c), que incluyen los residuos de aminoácido de HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) y 94-102 (H3).

A menos que se indique de otro modo, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo, los residuos de FR) se numeran en el presente documento de acuerdo con Kabat *et al.*, *supra*.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domésticos (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En determinados modos de realización, el individuo o sujeto es un ser humano.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha separado de un componente de su entorno natural. En algunos modos de realización, se purifica un anticuerpo a más de un 95 % o 99 % de pureza, como se determina, por ejemplo, por electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, HPLC de intercambio iónico o de fase inversa). Para una revisión de los procedimientos para la evaluación de la pureza de los anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman, S. *et al.*, J. Chromatogr. B 848 (2007) 79-87.

Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que contienen habitualmente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente de forma extracromosómica o en una localización cromosómica que sea diferente de su localización cromosómica natural.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes, en general, dichas variantes en cantidades menores. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos frente a diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige frente a un único determinante en un antígeno. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se ha obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo por ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar por una variedad de técnicas, incluyendo, pero sin limitarse al procedimiento de hibridoma, procedimientos de ADN recombinante, procedimientos de presentación en fagos y procedimientos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los locus de inmunoglobulina humana; describiéndose en el presente documento dichos procedimientos y otros procedimientos ejemplares para preparar anticuerpos monoclonales.

Los "anticuerpos naturales" se refieren a moléculas de inmunoglobulina natural con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos IgG naturales son glucoproteínas heterotetrámeras de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que se unen por disulfuros. Desde el extremo N al C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamada dominio pesado variable o dominio variable de la cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De forma similar, desde el extremo N al C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también llamada dominio ligero variable o dominio variable de la cadena ligera, seguida de un dominio ligero constante (CL). La cadena ligera de un anticuerpo se puede asignar a uno de dos tipos, llamados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), en base a la secuencia de

aminoácidos de su dominio constante.

El término "prospecto del envase" se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, politerapia, contraindicaciones y/o advertencias en relación con el uso de dichos productos terapéuticos.

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácido en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácido en la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin tener en consideración ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación con propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de diversas maneras que están dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, usando un programa informático disponible públicamente, tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la máxima alineación sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los propósitos en el presente documento, se generan valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 se creó por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE. UU., Washington D.C., 20559, donde se ha registrado con el n.º de registro de derechos de autor de EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente. Se debe compilar el programa ALIGN-2 para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Se establecen todos los parámetros de comparación de secuencias por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones donde se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada (que, de forma alternativa, se puede parafrasear como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula como sigue:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

donde X es el número de residuos de aminoácido puntuados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácido en B. Se apreciará que si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no igualará el % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se indique específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo precedente de inmediato usando el programa informático ALIGN-2.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en una forma tal que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma sea eficaz, y que no contiene ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al que se le administraría la formulación.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente de una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo, tales como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural del individuo que se trata, y que se puede realizar para su profilaxis o bien durante la evolución de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de metástasis, disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o atenuación del estado de la enfermedad y remisión o pronóstico mejorado. En algunos modos de realización, se usan los anticuerpos de la invención para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural, en general, tienen estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). (Véase, por ejemplo, Kindt, T.J. *et al.* Kuby Immunology, 6.ª ed., W.H. Freeman y Co., N.Y. (2007), página

91). Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular se pueden aislar usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una colección de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véanse, por ejemplo, Portolano, S. *et al.*, J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T. *et al.*, Nature 352 (1991) 624-628).  
 5 La numeración de los residuos de aminoácido en la región variable (región variable de la cadena ligera y de la cadena pesada) se realizará de acuerdo con Kabat (Kabat, E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.<sup>a</sup> ed., BethesdaMD (1991), NIH Publication 91-3242, vols. 1-3).

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al que se enlaza. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. Determinados vectores pueden dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que se enlazan de forma funcional. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

15 El término "barrera hematoencefálica" (BHE) indica la barrera fisiológica entre la circulación periférica y el cerebro y la médula espinal que está formada por uniones herméticas dentro de las membranas plasmáticas del endotelio de los capilares cerebrales, creando una barrera hermética que restringe el transporte de moléculas al cerebro, incluso moléculas muy pequeñas, tales como urea (60 Daltons). La BHE dentro del cerebro, la barrera hematomedular dentro de la médula espinal y la barrera hematorretiniana dentro de la retina son barreras capilares contiguas dentro del SNC, y se denominan conjuntamente en el presente documento barrera hematoencefálica o  
 20 BHE. La BHE también engloba la barrera hematocefalorraquídea (plexo coroideo) donde la barrera está compuesta por endotelios en lugar de células endoteliales de los capilares.

El término "sistema nervioso central" (SNC) indica el complejo de tejidos nerviosos que controlan la función corporal e incluye el cerebro y la médula espinal.

El término "receptor de la barrera hematoencefálica" (RBHE) indica una proteína receptora enlazada a la membrana extracelular expresada en células endoteliales cerebrales que puede transportar moléculas a través de la BHE o usarse para transportar moléculas administradas de forma exógena. Los ejemplos de RBHE incluyen, pero no se limitan a, receptor de transferrina (TfR), receptor de insulina, receptor del factor de crecimiento insulínico (IGF-R), receptores de lipoproteínas de baja densidad que incluyen, sin limitación, la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1) y la proteína 8 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP8), y factor de crecimiento similar al factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF). Un RBHE ejemplar es el receptor de transferrina (TfR).

El término "entidad efectora cerebral" indica una molécula que se va a transportar al cerebro a través de la BHE. La entidad efectora típicamente tiene una actividad terapéutica característica que se desea administrar al cerebro. Las entidades efectoras incluyen fármacos para trastornos neurológicos y agentes citotóxicos, tales como, por ejemplo, polipéptidos y anticuerpos, en particular, anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos dirigidos a una diana cerebral.

El término "entidad de unión monovalente" indica una molécula que se puede unir específicamente y en un modo de unión monovalente a un RBHE. El módulo lanzadera a través de la barrera hematoencefálica y/o conjugado como se informa en el presente documento están caracterizados por la presencia de una única unidad de una entidad de unión monovalente, es decir, el módulo lanzadera a través de la barrera hematoencefálica y/o conjugado de la presente invención comprenden exactamente una unidad de la entidad de unión monovalente. La entidad de unión monovalente incluye, pero no se limita a, polipéptidos, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo, incluyendo los fragmentos Fab, Fab', Fv, moléculas de anticuerpo monocatenario, tales como, por ejemplo, Fab monocatenario, scFv. La entidad de unión monovalente puede ser, por ejemplo, una proteína de andamiaje genomanipulada usando tecnologías del estado de la técnica como la presentación en fagos o inmunización. La entidad de unión monovalente también puede ser un polipéptido. En determinados modos de realización, la entidad de unión monovalente comprende un dominio CH2-CH3 de Ig y un Fab monocatenario (scFab) dirigido a un receptor de la barrera hematoencefálica. El scFab está acoplado al extremo C terminal del dominio CH2-CH3 de Ig por un conector. En determinados modos de realización, el scFab se dirige al receptor de transferrina.

El término "modo de unión monovalente" indica una unión específica al RBHE donde la interacción entre la entidad de unión monovalente y el RBHE tiene lugar a través de un único epítipo. El modo de unión monovalente previene cualquier dimerización/multimerización del RBHE debido a un único punto de interacción a través de epítipo. El modo de unión monovalente previene que se altere la separación intracelular del RBHE.

El término "epítipo" indica cualquier determinante polipeptídico que se pueda unir específicamente a un anticuerpo. En determinados modos de realización, los determinantes epítipo incluyen agrupamientos de moléculas químicamente activos en la superficie, tales como aminoácidos, cadenas laterales glucídicas, fosforilo o sulfonilo y, en determinados modos de realización, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que se une por un

anticuerpo.

El "receptor de transferrina" (TfR) es una glucoproteína transmembranaria (con un peso molecular de aproximadamente 180.000 Da) que está compuesta por dos subunidades unidas por disulfuro (cada una con un peso molecular aparente de aproximadamente 90.000 Da) y está implicada en la captación de hierro en los vertebrados. En un modo de realización, el TfR en el presente documento es TfR humano que comprende la secuencia de aminoácidos como se informa en Schneider *et al.* (Nature 311 (1984) 675 - 678).

El término "agente de formación de imágenes" indica un compuesto que tiene una o más propiedades que permiten detectar su presencia y/o localización directa o indirectamente. Los ejemplos de dichos agentes de formación de imágenes incluyen proteínas y compuestos de molécula pequeña que incorporan una entidad marcada que permite la detección.

Los términos "antígeno del SNC" y "diana cerebral" indican un antígeno y/o molécula expresada en el SNC, incluyendo el cerebro, que se puede seleccionar como diana con un anticuerpo o molécula pequeña. Los ejemplos de dicho antígeno y/o molécula incluyen, sin limitación, beta-secretasa 1 (BACE1), amiloide beta (Abeta), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), Tau, apolipoproteína E4 (ApoE4), alfa-sinucleína, CD20, huntingtina, proteína priónica (PrP), cinasa 2 de repetición rica en leucina (LRRK2), parkina, presenilina 1, presenilina 2, gamma-secretasa, receptor de muerte 6 (DR6), proteína precursora amiloidea (APP), receptor de neurotrofina p75 (p75NTR), glucocerebrosidasa y caspasa 6.

El término "que se une específicamente" indica un anticuerpo que se une selectiva o preferencialmente a un antígeno. La afinidad de unión se determina, en general, usando un ensayo estándar, tal como análisis de Scatchard, o la técnica de resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, usando BIACORE®).

El término "entidad de CH2-CH3 de Ig" como se usa en el presente documento se refiere a una entidad proteica derivada de los dominios CH2 o CH3 de inmunoglobulina. La "entidad de CH2-CH3 de Ig" comprende dos polipéptidos "CH2-CH3", que forman un dímero. La inmunoglobulina puede ser IgG, IgA, IgD, IgE o IgM. En un modo de realización, la entidad de CH2-CH3 de Ig derivó de una inmunoglobulina IgG y se denomina en el presente documento "entidad de CH2-CH3 de IgG". El término incluye la secuencia natural de los dominios CH2-CH3 y los dominios CH2-CH3 variantes. En un modo de realización, la "entidad de CH2-CH3 de Ig" deriva del dominio CH2-CH3 de IgG de la cadena pesada humana que se extiende desde Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxílico de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C terminal (Lys447) de la región Fc puede o no estar presente. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de los residuos de aminoácido en la región del dominio CH2-CH3 o región constante es de acuerdo con el sistema de numeración EU, también denominado índice EU, como se describe en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5,<sup>a</sup> ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Un "conjugado" es una proteína de fusión de la presente invención conjugada a una o más moléculas heterólogas incluyendo, pero sin limitarse a, un marcador, fármaco para trastornos neurológicos o agente citotóxico.

El término "conector" indica un conector químico o un conector peptídico monocatenario que conecta de forma covalente diferentes entidades del módulo lanzadera a través de la barrera hematoencefálica y/o el polipéptido de fusión y/o el conjugado como se informa en el presente documento. El conector conecta, por ejemplo, la entidad efectora cerebral a la entidad de unión monovalente. Por ejemplo, si la entidad de unión monovalente comprende una entidad de CH2-CH3 de Ig y un scFab dirigido al receptor de la barrera hematoencefálica, entonces el conector conjuga el scFab al extremo C terminal de la entidad de CH3-CH2 de Ig. El conector que conjuga la entidad efectora cerebral a la entidad de unión monovalente (primer conector) y el conector que conjuga el scFab al extremo C terminal del dominio CH2-CH3 de Ig (segundo conector) puede ser el mismo o diferente.

Se pueden usar conectores peptídicos monocatenarios, que comprenden de desde uno a veinte residuos de aminoácido unidos por enlaces peptídicos. En determinados modos de realización, los aminoácidos se seleccionan de los veinte aminoácidos naturales. En determinados de otros modos de realización, uno o más de los aminoácidos se seleccionan de glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina y lisina. En otros modos de realización, el conector es un conector químico. En determinados modos de realización, el conector es un conector peptídico monocatenario con una secuencia de aminoácidos con una longitud de al menos 25 residuos de aminoácido, en un modo de realización preferente con una longitud de 32 a 50 residuos de aminoácido. En un modo de realización, el conector peptídico es un conector (GxS)n con G = glicina, S = serina, (x = 3, n = 8, 9 o 10) o (x = 4 y n = 6, 7 o 8), en un modo de realización con x = 4, n = 6 o 7, en un modo de realización preferente con x = 4, n = 7. En un modo de realización, el conector es (G4S)4 (SEQ ID NO: 95). En un modo de realización, el conector es (G4S)6G2 (SEQ ID NO: 96).

La conjugación se puede realizar usando una variedad de conectores químicos. Por ejemplo, la entidad de unión monovalente o el polipéptido de fusión y la entidad efectora cerebral se pueden conjugar usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), iminotiolano (IT), derivados

bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). El conector puede ser un "conector escindible" que facilita la liberación de la entidad efectora después de su administración al cerebro. Por ejemplo, se puede usar un conector lábil en ácido, conector sensible a peptidasa, conector fotolábil, conector de dimetilo o conector que contiene disulfuro (Chari *et al*, Cancer Res. 52 (1992) 127-131; documento US 5.208.020).

La conjugación covalente puede ser directa o bien por medio de un conector. En determinados modos de realización, la conjugación directa es por construcción de una fusión polipeptídica (es decir, por la fusión genética de los dos genes que codifican la entidad de unión monovalente hacia el RBHE y la entidad efectora y que se expresa como un único polipéptido (cadena)). En determinados modos de realización, la conjugación directa es por formación de un enlace covalente entre un grupo reactivo de una de las dos porciones de la entidad de unión monovalente frente al RBHE y un correspondiente grupo o aceptor en la entidad efectora cerebral. En determinados modos de realización, la conjugación directa es por modificación (es decir, modificación genética) de una de las dos moléculas que se va a conjugar para incluir un grupo reactivo (como ejemplos no limitantes, un grupo sulfhidrilo o un grupo carboxilo) que forma una unión covalente con la otra molécula que se va a conjugar en las condiciones apropiadas. Como un ejemplo no limitante, una molécula (es decir, un aminoácido) con un grupo reactivo deseado (es decir, un residuo de cisteína) se puede introducir en, por ejemplo, la entidad de unión monovalente hacia el anticuerpo frente al RBHE, y formar un enlace disulfuro con el fármaco neurológico. Los procedimientos para la conjugación covalente de los ácidos nucleicos a proteínas también son conocidos en la técnica (es decir, fotorreticulación, véase, por ejemplo, Zetsepín *et al*. Russ. Chem. Rev. 74 (2005) 77-95). La conjugación también se puede realizar usando una variedad de conectores. Por ejemplo, una entidad de unión monovalente y una entidad efectora se pueden conjugar usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como 3-(2-piridilditio)propionato de succinimidilo (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). También se pueden usar conectores peptídicos compuestos por de uno a veinte residuos de aminoácido unidos por enlaces peptídicos. En determinados modos de realización de este tipo, los residuos de aminoácido se seleccionan de los veinte aminoácidos naturales. En determinados otros modos de realización de este tipo, uno o más de los residuos de aminoácido se seleccionan de glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina y lisina. El conector puede ser un "conector escindible" que facilita la liberación de la entidad efectora después de su administración al cerebro. Por ejemplo, se puede usar un conector lábil en ácido, conector sensible a peptidasa, conector fotolábil, conector de dimetilo o conector que contiene disulfuro (Chari *et al*, Cancer Res. 52 (1992) 127-131; documento US 5.208.020).

## II. Composiciones y procedimientos

Las constantes de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) se usan comúnmente para describir interacciones moleculares. Se usa como una medida de la fuerza de interacción de dos moléculas (por ejemplo, afinidad) entre sí. Por tanto, el valor de  $K_D$  es una medida de la fuerza de una interacción bimolecular.

Pero el valor de  $K_D$  como tal no describe la cinética de la interacción molecular, es decir, del valor de  $K_D$  no se puede deducir, por una parte, la rapidez con la que las dos moléculas se unen entre sí (constante de tasa de asociación o "asociación") y, por otra parte, la rapidez con la que se disocian las moléculas (constante de tasa de disociación o "disociación"). La caracterización de las interacciones bimoleculares solo por su valor de  $K_D$  ignora el hecho de que un valor de  $K_D$  idéntico puede estar compuesto por tasas de asociación y disociación extremadamente diferentes (diferentes órdenes de magnitud), ya que el valor de  $K_D$  es la proporción de las mismas.

Pero las tasas de asociación y disociación son importantes para caracterizar el comportamiento de unión de las moléculas. La tasa de disociación es especialmente importante porque caracteriza la duración de la unión, por ejemplo, de un anticuerpo a su antígeno. Una gran tasa de disociación se correlaciona con una disociación lenta del complejo formado, mientras que una pequeña tasa de disociación se correlaciona con una disociación rápida.

Para tener una interacción de larga duración (es decir, que requiera una dosificación menos frecuente) o personalizada (por ejemplo, dependiendo de las condiciones ambientales), las tasas de disociación se tienen que determinar experimentalmente. Esto es incluso más importante, ya que es casi imposible predecir la tasa de disociación. Adicionalmente, la correlación entre la tasa de disociación y la afinidad de unión es mala como se explica anteriormente. Por ejemplo, debido al hecho de que el valor de  $K_D$  es la proporción de la tasa de asociación y disociación, incluso las proteínas de unión débiles pueden permanecer unidas durante mucho tiempo a su diana, mientras que las proteínas de unión fuertes se pueden disociar rápidamente.

Un cuello de botella típico en los proyectos de generación de anticuerpos es la clasificación de los muchos

candidatos obtenidos después de la adsorción sobre la base de la fuerza de unión del anticuerpo. Idealmente, dicho procedimiento funcionará sin marcaje anterior de antígenos y con lisados bacterianos sin purificar. Ylera, F., *et al.* (Anal. Biochem. 441 (2013) 208-213) informaron de un procedimiento para el cribado de tasas de disociación para la selección de anticuerpos antifármaco de alta afinidad de lisados de *Escherichia coli* sin purificar que contienen fragmentos Fab monovalentes. Tienen la tasa de disociación elegida como parámetro de clasificación porque, entre otras cosas, la tasa de disociación es independiente de la concentración. Han elegido el formato monovalente para evitar los efectos de avidéz durante la clasificación de tasas de disociación y la determinación de la afinidad, ya que se observarían con IgG completa. Se ha descubierto por Ylera *et al.* que el clon con la mejor tasa de disociación se identificó por la etapa de clasificación de  $K_{dis}$ , pero no se habría identificado usando solo la intensidad de señal de ELISA como criterio de selección.

Murray, J.B., *et al.* (J. Med. Chem. 57 (2014) 2845-2850) informaron del cribado de tasas de disociación (ORS) por resonancia de plasmón superficial como un procedimiento eficaz para muestrear cinéticamente el espacio químico con cribado sistemático de posibles prototipos a partir de productos de reacción no purificados. Se explica que la constante de tasa de disociación  $k_d$  (tasa de disociación) es el componente de la unión ligando-proteína con el potencial más significativo para potenciar la potencia del compuesto. Los autores explican que medir la afinidad cinéticamente a lo largo de un programa de descubrimiento de fármacos es más informativo que la determinación del equilibrio de afinidad en estado estacionario. Por ejemplo, un compuesto con una tasa de asociación y disociación 10 veces más lenta no se reconocería como diferente si se evaluara por medidas de equilibrio de afinidad. Además, los autores han descubierto que los datos determinados con el instrumento BIAcore T200 muestran una diferencia promedio en las  $k_d$  entre muestras sin purificar y puras de un 19 %, de forma similar, los datos determinados con el instrumento BIAcore T100 más antiguo tenían una diferencia de un 15 %. Los autores observan que los  $k_d$  varían en un promedio de solo un 30 % cuando se comparan a través de instrumentos y a través del tiempo. Esto demuestra que la contaminación por arrastre, el almacenamiento a largo plazo y los diferentes equipos tienen un efecto modesto sobre las  $k_d$  observadas. De hecho, estas pequeñas desviaciones en las  $k_d$  reflejan estrechamente las diferencias observadas en estudios de laboratorios múltiples donde la variabilidad observada se ha informado que es de un 14 % a un 40 % dependiendo del sistema (Murray, J.B., *et al.*, J. Med. Chem. 57 (2014) 2845-2850; Katsamba, P.S., *et al.*, Anal. Biochem. 352 (2006) 208-221).

En el documento WO 2014/189973, se informa de anticuerpos anti-receptor de transferrina y procedimientos de uso. Se informa además de que la selección como diana de un receptor de la BHE con un anticuerpo de alta afinidad específico tradicional, en general, dio como resultado un incremento limitado en el transporte a través de la BHE. Luego, se descubrió que la magnitud de captación y distribución de anticuerpos en el SNC está inversamente relacionada con su afinidad de unión por el receptor de la BHE entre los anticuerpos anti-BHE estudiados. Por ejemplo, un anticuerpo de baja afinidad para el receptor de transferrina (TfR) dosificado a niveles de dosis terapéutica mejora, en gran medida, el transporte a través de la BHE y la retención en el SNC del anticuerpo anti-TfR en relación con un anticuerpo anti-TfR de mayor afinidad, y hace posible alcanzar más fácilmente concentraciones terapéuticas en el SNC (Atwal *et al.*, Sci. Transl. Med. 3 (2011) 84ra43). La prueba de dicho transporte a través de la BHE se logró usando un anticuerpo biespecífico que se une tanto a TfR como a la enzima de escisión de la proteína precursora amiloidea (APP),  $\beta$ -secretasa (BACE1). Una única dosis sistémica del anticuerpo anti-TfR/BACE1 biespecífico genomanipulado usando un anticuerpo de baja afinidad no solo dio como resultado una captación de anticuerpos significativa en el cerebro, sino que también redujo drásticamente los niveles de A $\beta$ 1-40 cerebral en comparación con solo el anti-BACE1 monoespecífico, lo que sugiere que la penetración a través de la BHE afecta a la potencia de anti-BACE1 (Atwal *et al.*, Sci. Transl. Med. 3 (2011) 84ra43; Yu *et al.*, Sci. Transl. Med. 3 (2011) 84ra44).

Los datos y experimentos disponibles destacan varios mecanismos causales detrás de la captación incrementada de un anticuerpo en el SNC usando un enfoque de anticuerpo de menor afinidad.

En primer lugar, los anticuerpos anti-receptor de la BHE (R-BHE) de alta afinidad (por ejemplo, el anticuerpo anti-TfR de Atwal *et al.* y Yu *et al.*, *supra*) limitan la captación cerebral saturando rápidamente el R-BHE en la vasculatura cerebral, reduciendo así la cantidad total de anticuerpo captado por el cerebro y restringiendo también su distribución a la vasculatura. Sorprendentemente, la reducción de la afinidad por el R-BHE mejora la captación y distribución cerebrales, con un sólido cambio observado en una localización desde la vasculatura a las neuronas y neurópilo asociado distribuido dentro del SNC. Se ha descubierto que la afinidad tiene que estar por debajo de un determinado nivel superior y por encima de un determinado nivel inferior.

En segundo lugar, se propone la menor afinidad del anticuerpo por el R-BHE para alterar la capacidad del anticuerpo de regresar al lado vascular de la BHE por medio del R-BHE desde el lado del SNC de la membrana debido a que la afinidad global del anticuerpo por el R-BHE es baja y la concentración local del anticuerpo en el lado del SNC de la BHE no es saturante debido a la rápida dispersión del anticuerpo en el compartimento del SNC.

En tercer lugar, *in vivo*, y como se observa para el sistema de TfR, los anticuerpos con menos afinidad por el R-BHE no se eliminan del sistema tan eficazmente como los que tienen mayor afinidad por el R-BHE y, por tanto, permanecen a mayores concentraciones circulantes que sus homólogos de mayor afinidad. Esto es ventajoso porque los niveles de anticuerpos circulantes del anticuerpo de menor afinidad se mantienen a niveles terapéuticos



durante un periodo de tiempo más largo que el anticuerpo de mayor afinidad que, en consecuencia, mejora la captación de anticuerpo en el cerebro durante un periodo de tiempo más largo. Además, esta mejoría tanto en la exposición de plasma como en la de cerebro puede reducir la frecuencia de dosificación en la clínica, lo que tendría beneficio potencial, no solamente para el cumplimiento y la comodidad del paciente, sino también en la disminución de los efectos secundarios potenciales o efectos fuera de diana del anticuerpo y/o de un compuesto terapéutico acoplado al mismo.

Estos estudios anteriores utilizaron anticuerpos de ratón que se unieron específicamente a TfR de ratón, pero que no reconocieron específicamente TfR de primate o humano. En consecuencia, en el presente documento se proporcionan anticuerpos y partes funcionales de los mismos que reconocen específicamente tanto TfR de primate, especialmente de macaco cangrejero, como humano, para facilitar los estudios de seguridad y eficacia en primates con los anticuerpos antes del uso terapéutico o diagnóstico en seres humanos.

Es muy importante una evaluación de la seguridad no clínica exhaustiva de los anticuerpos monoclonales (mAb) destinados a su aplicación terapéutica debido a la creciente complejidad de los aspectos de la genomanipulación de anticuerpos y la variabilidad inducida por la diversidad de sistemas de células de producción recombinantes para la generación de anticuerpos. Además, su estructura compleja, funciones biológicas únicas y las vidas medias más largas de los mAb en comparación con los fármacos de molécula pequeña tradicionales se suman a las consideraciones de seguridad, además de las preocupaciones debido al uso clínico prolongado de los mAb para el tratamiento de enfermedades crónicas (Lynch, C.M., *et al.*, mAbs 1 (2009) 2-11; Kim, S.J., *et al.*, Mol. Cells 20 (2005) 17-29).

El objetivo global de los estudios no clínicos para mAb es definir las propiedades toxicológicas del mAb en cuestión y proporcionar información para el desarrollo de productos. Los principales objetivos de la evaluación no clínica son (1) la identificación de órganos diana en cuanto a la toxicidad y determinar si la toxicidad es reversible tras el tratamiento, (2) la identificación de una dosis de partida segura para ensayos clínicos de fase I en seres humanos y esquemas de aumento de la dosis posteriores, (3) proporcionar información para supervisar los parámetros de seguridad en los ensayos clínicos y (4) proporcionar datos de seguridad para respaldar las afirmaciones en la etiqueta del producto. Para lograr estos objetivos, se llevan a cabo estudios no clínicos tanto *in vitro* como *in vivo* destinados a definir y entender las propiedades farmacológicas del anticuerpo (Lynch, C.M., *et al.*, mAbs 1 (2009) 2-11; Cavagnaro, J.A., en: Cavagnaro, J.A. (Ed.) "Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals"; Hoboken, NJ: Wiley 2008; 45-65).

Para una satisfactoria evaluación de la seguridad no clínica de un mAb, se deben elegir las especies animales más pertinentes para las pruebas de toxicidad (Lynch, C.M., *et al.*, mAbs 1 (2009) 2-11; Chapman, K., *et al.*, Nat. Rev. Drug Discov. 6 (2007) 120-126). Una especie pertinente es una en la que el anticuerpo sea farmacológicamente activo, el antígeno diana deba estar presente o expresarse y el perfil de reactividad cruzada tisular deba ser similar al de los seres humanos (Lynch, C.M., *et al.*, mAbs 1 (2009) 2-11; Chapman, K., *et al.*, Nat. Rev. Drug Discov. 6 (2007) 120-126; Subramanyam, M. y Mertsching, E., en: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205; Hall, W.C., *et al.*, en: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). Usando ensayos inmunoquímicos o funcionales, se puede identificar una especie animal pertinente que expresa el epítipo deseado y demuestra un perfil de reactividad cruzada tisular similar a los tejidos humanos (Lynch, C.M., *et al.*, mAbs 1 (2009) 2-11; Hall, W.C., *et al.*, en: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). Los estudios de reactividad cruzada entre especies, que son útiles en este procedimiento, implican un estudio inmunohistoquímico de tejidos de una variedad de especies usando micromatrices tisulares de múltiples especies disponibles comercialmente (Lynch, C.M., *et al.*, mAbs 1 (2009) 2-11; Hall, W.C., *et al.*, en: Cavagnaro, J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 207-240). De forma alternativa, la evaluación de la unión de anticuerpo a las células de estos animales por separación de células activada por flujo (FACS) típicamente es más sensible que el análisis inmunohistoquímico de cortes de tejido (Lynch, C.M., *et al.*, mAbs 1 (2009) 2-11; Subramanyam, M. y Mertsching, E., en: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205). Las secuencias de ADN y de aminoácidos del antígeno diana se deben comparar entre especies; se debe determinar la homología entre especies (Lynch, C.M., *et al.*, mAbs 1 (2009) 2-11; Subramanyam, M. y Mertsching, E., en: Cavagnaro J.A. (Ed.); Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken, NJ: Wiley 2008; 181-205).

Además, la biodistribución, función y estructura del antígeno deben ser comparables entre las especies animales pertinentes y los seres humanos para permitir la evaluación de la toxicidad que surge de la unión al anticuerpo del antígeno diana, lo que se denomina toxicidad específica (Lynch, C.M., *et al.*, mAbs 1 (2009) 2-11; 19,20). Además, las fuertes similitudes en la distribución tisular de antígenos diana en las especies animales y seres humanos hacen que sea más probable que los órganos diana de toxicidad identificada en animales predigan las posibles toxicidades en seres humanos. Una carencia de similitud en la distribución tisular de antígenos entre las especies animales y seres humanos no excluye totalmente el uso de las especies animales para estudios de toxicidad, pero estas diferencias se deben tener en consideración para la evaluación del riesgo en seres humanos. En cuanto a la afinidad o densidad antigénica, de forma similar, no se requiere ninguna equivalencia absoluta entre el modelo animal y los seres humanos. La justificación para la pertinencia de las especies seleccionadas para las pruebas

de toxicidad se debe incluir en la documentación reglamentaria. Si solo se usa una especie para la evaluación de la seguridad, se justifica un resumen de los experimentos que demuestren la ausencia de especies pertinentes adicionales (Lynch, C.M., *et al.*, mAbs 1 (2009) 2-11).

5 Si el anticuerpo monoclonal destinado a un uso terapéutico no tiene ninguna reactividad cruzada entre especies, se tiene que usar un anticuerpo sustituto o bien una especie diferente para el modelo. Por tanto, los anticuerpos sustitutos son una solución potencial para las pruebas de seguridad limitadas posibles con anticuerpos monoclonales humanizados con reactividad cruzada entre especies restringida. Sin embargo, actualmente no existen criterios definidos por los que se deba juzgar un posible anticuerpo sustituto antes de su uso para  
10 determinar cuestiones de seguridad para el agente clínico (Regulatory Toxicology and Pharmacology, volumen 40, número 3, diciembre de 2004, páginas 219-226).

Por tanto, para identificar un modelo animal para un mAb particular, se tienen que realizar las consideraciones anteriores. Sin embargo, es necesario que el mAb en cuestión tenga una reactividad cruzada con el antígeno diana de la especie de prueba. De otro modo, no se pueden usar ni siquiera las especies de prueba más adecuadas. Por lo tanto, existe la necesidad de obtener mAb que no tengan ninguna reactividad cruzada intraespecie, sino una reactividad cruzada interespecie con su diana en seres humanos y las especies destinadas a ensayos no clínicos.

20 **A. Anticuerpos antitransferrina ejemplares**

En el presente documento se informa de anticuerpos anti-receptor de transferrina que tienen una tasa de disociación para su unión al receptor de transferrina humano que está dentro de un determinado intervalo para garantizar el transporte a través de la BHE adecuado. Se ha descubierto que este intervalo se define en un extremo por la tasa de disociación del anticuerpo anti-receptor de transferrina 128.1 murino (secuencias de aminoácidos de dominio variable dadas en SEQ ID NO: 64 y 65) determinada por resonancia de plasmón superficial para el receptor de transferrina de macaco cangrejero y en el otro extremo en un 5 % de esa tasa de disociación (es decir, una disociación 20 veces más lenta). En un modo de realización, la tasa de disociación para el receptor de transferrina humano está entre e incluye 0,1 1/s y 0,005 1/s.

30 Los anticuerpos humanizados del clon 299 de acuerdo con la invención no estaban disponibles aplicando técnicas de humanización estándar. Se requirió introducir mutaciones no estándar en la secuencia de aminoácidos para obtener un anticuerpo humanizado con tasas de disociación de unión al receptor de transferrina dentro del intervalo destinado de y que incluye 0,1 1/s y 0,005 1/s. Esto es especialmente importante, ya que los anticuerpos como se informa en el presente documento se desarrollan para cruzar la barrera hematoencefálica humana para transportar  
35 una carga activa terapéutica al cerebro.

Se ha descubierto que para obtener un anticuerpo humanizado adecuado y desarrollable, dos residuos de aminoácido cisteína en la cadena ligera del anticuerpo de conejo original se tenían que reemplazar por un residuo de aminoácido prolina y asparagina, respectivamente. Además de estar dentro del intervalo de tasas de disociación dado, un residuo de serina presente en el medio de la CDRL3 de conejo se tuvo que reemplazar por un residuo de alanina.

40 Se ha descubierto además que es ventajoso cambiar tres residuos de aminoácido en la cadena pesada en las posiciones 65, 100g y 105 (numeración de acuerdo con Kabat).

45 Toda la numeración como se usa en el presente documento se basa en el esquema de numeración de los dominios variables de Kabat.

50 El clon 299 de anticuerpo antitransferrina de conejo mostró propiedades comparables a las del anticuerpo anti-receptor de transferrina 128.1. Esto se puede ver a partir de la siguiente tabla.

origen	carga de transcitosis [pg]	% de transcitosis basolateral	total basolateral [pg]	total apical [pg]	suma transportada [pg]
mAb 128.1	2226	34	757	1229	1986
clon 299	2773	36	998	1346	2344
origen	% de carga de mAb 128.1	% total basolateral de mAb 128.1	% total apical de mAb 128.1	% de suma transportada de mAb 128.1	CE50 [ng/ml] FACS hTfR-CHO
mAb 128.1	100	100	100	100	96
clon 299	125	132	110	118	275

ES 2 908 009 T3

origen	máx. media geo. hTfR-CHO	CE50 [ng/ml] FACS cyTfR	máx. media geo. TfR de macaco cangrejero-CHO	proporción CE50 macaco cangrejero/humano	proporción máx. macaco cangrejero/humano
mAb 128.1	78200	314	52100	3,3	0,6
clon 299	55600	241	52000	0,9	1,0
origen	tasa de disociación por BIAcore huTfR [1/s]	BIAcore t1/2 huTfR [min]	tasa de disociación por BIAcore cyTfR [1/s]	BIAcore t1/2 TfR de macaco cangrejero [min]	proporción t1/2 humano/macaco cangrejero
mAb 128.1	6,06E-04	19	5,47E-02	0,2	90,2
clon 299	6,16E-04	19	2,77E-04	42	0,4

En la siguiente tabla se muestran las tasas de disociación de las variantes de humanización del dominio variable de la cadena ligera de conejo del clon 299 en combinación con variantes de humanización del dominio variable de la cadena pesada de conejo del clon 299. El compañero de unión fue el receptor de transferrina humano (determinado a 25 °C).

5

VH → VL ↓	0 (rb)	1	2	5	6	7	8	9	11	12
0 (rb)	4,34E-04	9,08E-04	8,06E-04	7,72E-04	6,63E-04	5,15E-04	4,06E-04	9,01E-04	9,05E-04	9,21E-04
1	5,69E-03	1,00E-03	1,00E-03	1,00E-03	1,00E-03	7,52E-03	3,19E-03	6,94E-03	1,00E-03	1,00E-03
2	1,25E-03	2,86E-03	2,75E-03	2,41E-03	1,87E-03	1,31E-03	1,01E-03	3,99E-03	3,85E-03	6,35E-03
3	1,32E-03	4,31E-03	3,84E-03	3,16E-03	2,82E-03	1,45E-03	1,00E-03	4,17E-03	5,65E-03	5,86E-03
4	1,36E-03	2,56E-03	2,63E-03	2,38E-03	1,87E-03	1,25E-03	7,88E-04	2,70E-03	3,88E-03	3,11E-03
5	1,94E-03	2,71E-03	2,62E-03	2,53E-03	1,66E-03	1,35E-03	1,07E-03	3,50E-03	4,56E-03	5,82E-03
6	1,90E-03	5,38E-03	5,55E-03	4,64E-03	3,06E-03	1,97E-03	1,40E-03	6,83E-03	6,71E-03	7,05E-03
7	4,63E-03	7,33E-03	7,50E-03	6,97E-03	5,63E-03	3,66E-03	2,31E-03	7,61E-03	7,81E-03	7,71E-03
8	1,39E-03	4,85E-03	3,94E-03	3,78E-03	3,01E-03	1,72E-03	1,16E-03	5,23E-03	5,52E-03	5,31E-03
9-NY A	1,41E-03	2,46E-03	2,21E-03	2,03E-03	1,41E-03	1,21E-03	1,01E-03	2,52E-03	2,42E-03	2,19E-03
10	1,88E-03	6,77E-03	6,49E-03	6,53E-03	4,55E-03	2,64E-03	1,73E-03	7,19E-03	7,16E-03	7,79E-03
12	5,41E-03	7,05E-03	8,14E-03	1,00E-03	7,78E-03	7,75E-03	6,72E-03	1,00E-03	7,87E-03	1,00E-03
14	1,78E-03	2,99E-03	2,44E-03	2,33E-03	2,20E-03	1,53E-03	1,04E-03	3,32E-03	3,51E-03	5,46E-03
15	6,63E-03	6,69E-03	6,38E-03	6,37E-03	4,21E-03	2,73E-03	1,81E-03	7,39E-03	7,09E-03	7,76E-03
17	1,49E-03	7,56E-03	7,12E-03	7,45E-03	7,17E-03	1,87E-03	1,12E-03	4,25E-03	7,55E-03	7,27E-03
VH → VL ↓	13	15	16	17	18	19	20	21	22	23-DAN G
0 (rb)	4,82E-04	7,63E-04	6,53E-04	4,13E-04	1,09E-03	1,00E-03	1,11E-03	5,65E-04	5,06E-04	3,38E-04
1	1,00E-03	7,72E-03	7,71E-03	4,33E-03	1,00E-03	1,00E-03	1,00E-03	7,71E-03	5,78E-03	2,80E-03
2	2,46E-03	2,16E-03	1,97E-03	1,05E-03	4,89E-03	7,69E-03	5,25E-03	1,38E-03	1,26E-03	7,15E-04
3	2,77E-03	2,07E-03	1,73E-03	8,43E-04	6,65E-03	1,00E-03	7,15E-03	1,94E-03	1,43E-03	7,83E-04
4	1,30E-03	1,34E-03	1,27E-03	7,23E-04	3,35E-03	1,00E-03	4,36E-03	1,46E-03	1,18E-03	7,61E-04
5	2,18E-03	2,14E-03	2,23E-03	1,23E-03	3,49E-03	1,00E-03	3,52E-03	1,37E-03	1,41E-03	8,80E-04
6	3,65E-03	3,50E-03	3,39E-03	1,71E-03	6,74E-03	1,00E-03	6,06E-03	2,07E-03	2,14E-03	1,16E-03
7	6,68E-03	5,43E-03	5,25E-03	2,33E-03	7,66E-03	1,00E-03	7,14E-03	2,38E-03	3,37E-03	1,55E-03
8	2,47E-03	2,09E-03	1,97E-03	1,11E-03	6,77E-03	6,71E-03	6,58E-03	1,74E-03	1,65E-03	9,41E-04
9-NY A	1,39E-03	1,42E-03	1,36E-03	9,34E-04	2,21E-03	6,17E-03	1,89E-03	1,13E-03	1,26E-03	7,69E-04

## ES 2 908 009 T3

10	5,89E-03	3,99E-03	4,24E-03	1,88E-03	7,46E-03	1,00E-03	7,05E-03	2,11E-03	2,09E-03	1,20E-03
12	7,85E-03	7,64E-03	7,54E-03	2,84E-03	1,00E-03	1,00E-03	1,00E-03	7,54E-03	6,44E-03	1,87E-03
14	2,22E-03	1,94E-03	1,75E-03	1,05E-03	3,00E-03	7,96E-03	2,39E-03	1,03E-03	1,12E-03	7,33E-04
15	7,11E-03	6,03E-03	4,77E-03	1,56E-03	7,58E-03	1,00E-03	7,85E-03	1,92E-03	1,79E-03	9,86E-04
17	3,39E-03	1,69E-03	1,66E-03	9,88E-04	5,30E-03	1,00E-03	4,57E-03	9,97E-04	9,38E-04	6,94E-04

La combinación de VH23 con VL9 se eligió como punto de partida para la genomanipulación adicional para desarrollar un sitio de unión que refleje las propiedades de unión del anticuerpo 128.1 al receptor de transferrina de macaco cangrejero con respecto a la unión al receptor de transferrina humano más estrechamente.

5

En la siguiente tabla, se muestran, en comparación, las tasas de disociación de diferentes variantes ejemplares de VH23 y VL9, así como otras diferentes variantes de humanización de dominio variable para el receptor de transferrina humano (determinadas de acuerdo con el ejemplo 14, 25 °C).

	VK9-NYA	VK9-SYA	VK9-GYS	VK9-CYS	VH567-P...NYA	VK12-HYS	VK17-TYS	VK15-AYS	VK2-SYS	VK6-SYS
VH23-DANG	8,83E-03		3,96E-03		4,62E-03	1,53E-02	2,29E-03	6,97E-03	5,22E-03	1,32E-02
VH23-DASG	3,95E-02	4,84E-04	3,73E-03	2,33E-03						
VH23-DAQG	1,49E-02	7,55E-04	3,75E-03	1,51E-03						
VH9-DANG	1,82E-03			6,52E-03					4,02E-02	
VH9-DAQG	1,25E-03									
VH7-DANG										3,08E-02
referencia: 128.1 = 7,78E-02 (determinado para el receptor de transferrina de macaco cangrejero).										

En la siguiente tabla se muestran en comparación los datos cinéticos de diferentes variantes ejemplares de VH23 y VL9 (determinadas de acuerdo con el ejemplo 13).

Ensayo BIAcore a 25 °C	TfR	kd [s <sup>-1</sup> ]	ka [s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> ]	kD [M]
mAb 128.1	macaco cangrejero	7,33E-02	5,41E+05	1,36E-07
VH23-DASG/VL09-NYA	humano	3,95E-02	8,83E+04	4,47E-07
VH23-DAQG/VL09-NYA	humano	1,37E-02	1,21E+05	1,13E-07
VH23-DANG/VL09-NYA	humano	8,83E-03	1,55E+05	5,72E-08

5

En la siguiente tabla se muestran las tasas de disociación de variantes de humanización del dominio variable de la cadena ligera murina del clon 494 en combinación con variantes de humanización del dominio variable de la cadena pesada murina del clon 494. El compañero de unión fue el receptor de transferrina humano.

VH → VL ↓	0 (mu)	1	2	3	4
0 (mu)	1,36E-04	1,37E-04	1,56E-04	1,48E-04	1,77E-04
1	3,70E-04	4,10E-04	4,54E-04	4,76E-04	4,48E-04
2	3,64E-04	3,99E-04	4,26E-04	4,15E-04	4,38E-04
3	3,39E-04	3,86E-04	4,30E-04	4,34E-04	4,52E-04
4	5,42E-04	6,57E-04	7,03E-04	6,83E-04	7,05E-04
5	5,44E-04	6,84E-04	7,17E-04	7,17E-04	7,28E-04
6	3,81E-04	4,86E-04	5,27E-04	5,50E-04	5,52E-04
7	2,32E-04	2,74E-04	2,99E-04	3,06E-04	3,26E-04

10

En más detalle, en un aspecto, la invención se basa, en parte, en el hallazgo de que se puede usar el anticuerpo anti-receptor de transferrina como se informa en el presente documento como módulo lanzadera a través de la barrera hematoencefálica para administrar una entidad efectora cerebral al cerebro a través de la barrera hematoencefálica. En determinados modos de realización, el módulo lanzadera a través de la barrera hematoencefálica es una entidad de unión monovalente que se une específicamente al receptor de transferrina. Los anticuerpos anti-receptor de transferrina como se informa en el presente documento, cuando se usan como módulo lanzadera a través de la barrera hematoencefálica, son útiles, por ejemplo, para el diagnóstico o tratamiento de trastornos neurológicos, tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer concurrente con enfermedad de Parkinson.

20

Se ha descubierto que un anticuerpo que comprende el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y el dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 refleja, con respecto al receptor de transferrina humano, las propiedades de unión del anticuerpo murino 128.1 con respecto al receptor de transferrina de macaco cangrejero con respecto a la tasa de disociación de unión.

25

En consecuencia, un aspecto, como se informa en el presente documento, es un anticuerpo aislado que se une al receptor de transferrina humano (huTfR) y al receptor de transferrina de macaco cangrejero (cyTfR), en el que el anticuerpo tiene una tasa de disociación determinada por resonancia de plasmón superficial para el receptor de transferrina humano entre 0,1 1/s y 0,005 1/s.

30

Otro aspecto divulgado en el presente documento es el uso de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une al receptor de transferrina humano (huTfR) y al receptor de transferrina de macaco cangrejero (cyTfR), en el que el anticuerpo tiene una tasa de disociación determinada por resonancia de plasmón superficial para el receptor de transferrina humano entre 0,1 1/s y 0,005 1/s, para la administración de una entidad terapéutica a través de la barrera hematoencefálica.

35

En un modo de realización, la tasa de disociación se determina a 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 y 0 nM.

40

En un modo de realización, la tasa de disociación se determina usando un chip de resonancia de plasmón superficial con una superficie de biotina y un tampón de migración de 1xPBS complementado con cloruro de sodio 250 mM a un caudal de 10 µl/min.

En un modo de realización, la asociación se supervisa durante 180 segundos y la disociación se supervisa durante

600 segundos.

En un modo de realización, la tasa de disociación se determina en un BIAcore T200.

5 En un modo de realización, la tasa de disociación está entre 0,08 1/s y 0,008 1/s.

En un modo de realización de todos los aspectos, la tasa de disociación se determina a 25 °C.

10 En un modo de realización de todos los aspectos, la tasa de disociación es la tasa de disociación determinada a 25 °C.

15 Un aspecto, como se informa en el presente documento, es un anticuerpo anti-receptor de transferrina que se une específicamente al receptor de transferrina humano (huTfR) y al receptor de transferrina de macaco cangrejero (cyTfR), que comprende i) un dominio variable de la cadena pesada humanizado derivado del dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 01 y ii) un dominio variable de la cadena ligera humanizado derivado del dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 26, en el que el dominio variable de la cadena ligera tiene, en la posición 80, un residuo de aminoácido prolina (P), en la posición 91, un residuo de aminoácido asparagina (N) y, en la posición 93, un residuo de aminoácido alanina (A) (numeración de acuerdo con Kabat).

20 En un modo de realización, el anticuerpo tiene además, en el dominio variable de la cadena pesada, en la posición 100g, un residuo de aminoácido serina (S) (numeración de acuerdo con Kabat).

25 En un modo de realización, el anticuerpo tiene además, en el dominio variable de la cadena pesada, en la posición 65, un residuo de aminoácido serina (S) (numeración de acuerdo con Kabat).

En un modo de realización, el anticuerpo tiene además, en el dominio variable de la cadena pesada, en la posición 105, un residuo de aminoácido glutamina (Q) (numeración de acuerdo con Kabat).

30 Un aspecto, como se informa en el presente documento, es un anticuerpo anti-receptor de transferrina que se une específicamente al receptor de transferrina humano (huTfR) y al receptor de transferrina de macaco cangrejero (cyTfR), que comprende i) un dominio variable de la cadena pesada humanizado derivado del dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 01 y ii) un dominio variable de la cadena ligera humanizado derivado del dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 26, en el que el anticuerpo tiene una tasa de disociación en la unidad 1/s para el receptor de transferrina humano que es igual a o menor que (es decir, como máximo) la tasa de disociación en la unidad 1/s del anticuerpo anti-receptor de transferrina 128.1 para el receptor de transferrina de macaco cangrejero, con lo que las tasas de disociación se determinan por resonancia de plasmón superficial, y con lo que el anticuerpo anti-receptor de transferrina 128.1 tiene un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 64 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 65.

40 En un modo de realización, el anticuerpo tiene una tasa de disociación en la unidad 1/s para el receptor de transferrina humano que es i) igual a o menor que (es decir, como máximo) la tasa de disociación en la unidad 1/s del anticuerpo anti-receptor de transferrina 128.1 para el receptor de transferrina de macaco cangrejero e ii) igual a o mayor que (es decir, al menos) un 5 % de la tasa de disociación en la unidad 1/s del anticuerpo anti-receptor de transferrina 128.1 para el receptor de transferrina de macaco cangrejero.

45 Un aspecto, como se informa en el presente documento, es un anticuerpo anti-receptor de transferrina que se une específicamente al receptor de transferrina humano (huTfR) y al receptor de transferrina de macaco cangrejero (cyTfR). En determinados modos de realización, un anticuerpo anti-receptor de transferrina

50 • se une al receptor de transferrina humano (huTfR) y al receptor de transferrina de macaco cangrejero (cyTfR);

55 • tiene una tasa de disociación en la unidad 1/s para el receptor de transferrina humano que es igual a o menor que (es decir, como máximo) la del anticuerpo anti-receptor de transferrina 128.1 para el receptor de transferrina de macaco cangrejero, con lo que las tasas de disociación se determinan por resonancia de plasmón superficial, y con lo que el anticuerpo anti-receptor de transferrina 128.1 tiene un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 64 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 65;

60 • se une con una tasa de disociación para el receptor de transferrina humano que está entre e incluye 0,1 1/s y 0,005 1/s.

65 En el presente documento se proporciona un anticuerpo anti-receptor de transferrina que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68; (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71, 72 o 73; (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75; (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 76; y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78.

5 En cualquiera de los modos de realización anteriores, el anticuerpo anti-receptor de transferrina está humanizado. En un modo de realización, un anticuerpo anti-receptor de transferrina comprende HVR como en cualquiera de los modos de realización anteriores, y comprende además una región estructural humana aceptora, por ejemplo, una región estructural de inmunoglobulina humana o una región estructural consenso humana.

10 En otro aspecto, un anticuerpo anti-receptor de transferrina comprende una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (VH) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y que tiene aproximadamente la misma tasa de disociación que un anticuerpo que comprende una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 24. En determinados modos de realización, una secuencia de VH que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones en relación con la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-receptor de transferrina que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse al receptor de transferrina con la misma tasa de disociación. En determinados modos de realización, se han sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en SEQ ID NO: 24. En determinados modos de realización, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR).  
20 Opcionalmente, el anticuerpo anti-receptor de transferrina comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 24, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En un modo de realización particular, el VH comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de: (a) una HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66, (b) una HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68, y (c) una HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72.

25 En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-receptor de transferrina, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera (VL) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y que tiene aproximadamente la misma tasa de disociación que un anticuerpo que comprende una secuencia de dominio variable de la cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 37. En determinados modos de realización, una secuencia de VL que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones en relación con la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-receptor de transferrina que comprende esa secuencia retiene la capacidad de unirse al receptor de transferrina con la misma tasa de disociación. En determinados modos de realización, se han sustituido, insertado y/o eliminado un total de 1 a 10 aminoácidos en SEQ ID NO: 37. En determinados modos de realización, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-receptor de transferrina comprende la secuencia de VL en SEQ ID NO: 37, incluyendo las modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En un modo de realización particular, el VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de (a) una HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75, (b) una HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76, y (c) una HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78.

45 En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-receptor de transferrina, en el que el anticuerpo comprende un VH como en cualquiera de los modos de realización proporcionados anteriormente, y un VL como en cualquiera de los modos de realización proporcionados anteriormente. El anticuerpo de la invención comprende las secuencias de VH y VL en SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 37, respectivamente, incluyendo modificaciones postraduccionales de esas secuencias.

50 En un modo de realización, un anticuerpo anti-receptor de transferrina es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o F(ab')<sub>2</sub>. En otro modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo IgG1 inalterado u otra clase o isotipo de anticuerpo como se define en el presente documento.

55 En un modo de realización de todos los aspectos, el anticuerpo se acopla a un compuesto terapéutico.

En otro modo de realización de todos los aspectos, el anticuerpo se acopla a un agente de formación de imágenes o un marcador.

60 En otro modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico y el compuesto terapéutico forma opcionalmente una porción del anticuerpo multiespecífico. En un modo de realización de este tipo, el anticuerpo multiespecífico comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a TfR y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a un antígeno cerebral. En un aspecto de este tipo, el antígeno cerebral se selecciona del grupo que consiste en: beta-secretasa 1 (BACE1), Abeta, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), tau, apolipoproteína E (ApoE), alfa-sinucleína, CD20, huntingtina, proteína priónica (PrP), cinasa 2 de repetición rica en leucina (LRRK2), parkina, presenilina 1, presenilina 2, gamma-secretasa, receptor de muerte 6 (DR6), proteína precursora amiloidea (APP), receptor de



- 5 neurotrofina p75 (p75NTR), glucocerebrosidasa y caspasa 6. En otro modo de realización, el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a BACE1. En otro modo de realización, el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a Abeta. En otro modo de realización, el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a alfa-sinucleína. En otro modo de realización, el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a CD20. En otro modo de realización, el anticuerpo multiespecífico se une tanto a TfR como a glucocerebrosidasa. En otro modo de realización, el compuesto terapéutico es un fármaco para trastornos neurológicos.
- 10 En un aspecto del modo de realización anterior, la invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 En un aspecto del modo de realización anterior, la invención proporciona cualquiera de los anticuerpos anteriores para su uso como medicamento.
- 20 En otro aspecto del modo de realización anterior, la invención proporciona el uso de cualquiera de los anticuerpos anteriores en la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno neurológico. En un modo de realización, el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en un trastorno neuropático, una enfermedad neurodegenerativa, cáncer, un trastorno por enfermedad ocular, un trastorno convulsivo, una enfermedad de almacenamiento lisosómico, amiloidosis, una enfermedad vírica o microbiana, isquemia, un trastorno del comportamiento e inflamación del SNC.
- 25 En otro aspecto del modo de realización anterior, la invención proporciona cualquiera de los anticuerpos anteriores para su uso en el tratamiento de un trastorno neurológico. En un modo de realización, el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en un trastorno neuropático, una enfermedad neurodegenerativa, cáncer, un trastorno por enfermedad ocular, un trastorno convulsivo, una enfermedad de almacenamiento lisosómico, amiloidosis, una enfermedad vírica o microbiana, isquemia, un trastorno del comportamiento e inflamación del SNC.
- 30 En otro aspecto del modo de realización anterior, se proporciona el uso de cualquiera de los anticuerpos anteriores en la fabricación de un medicamento para transportar uno o más compuestos a través de la BHE.
- 35 En un modo de realización, el anticuerpo se modifica en una o más propiedades seleccionadas de la función efectora de la región Fc de anticuerpo, la función de activación del complemento del anticuerpo y la afinidad del anticuerpo por TfR.
- En un modo de realización, la propiedad es la función efectora de la región Fc de anticuerpo.
- En un modo de realización, la propiedad es la función de activación del complemento del anticuerpo.
- 40 En un modo de realización, la propiedad es la afinidad del anticuerpo por TfR.
- 45 En un modo de realización, la función efectora o función de activación del complemento se ha reducido o eliminado en relación con un anticuerpo natural del mismo isotipo. En un modo de realización, la función efectora se reduce o elimina por un procedimiento seleccionado de reducción de la glucosilación del anticuerpo, modificación del isotipo de anticuerpo a un isotipo que, de forma natural, tenga una función efectora reducida o eliminada y modificación de la región Fc.
- 50 En un modo de realización, la función efectora se reduce o elimina por reducción de la glucosilación del anticuerpo. En un modo de realización, la glucosilación del anticuerpo se reduce por un procedimiento seleccionado de: producción del anticuerpo en un entorno que no permite la glucosilación natural; retirada de los grupos carbohidratados ya presentes en el anticuerpo; y modificación del anticuerpo de modo que no se produzca la glucosilación natural.
- 55 En un modo de realización, la glucosilación del anticuerpo se reduce por la producción del anticuerpo en un entorno que no permite la glucosilación natural, tal como la producción en un sistema de producción de células distintas de mamífero o donde el anticuerpo se produce sintéticamente. En un modo de realización, el anticuerpo se produce en un sistema de producción de células distintas de mamífero. En otro modo de realización, el anticuerpo se produce sintéticamente.
- 60 En un modo de realización, la glucosilación del anticuerpo se reduce por la modificación del anticuerpo de modo que no se produzca la glucosilación natural, tal como en la que la región Fc del anticuerpo comprende una mutación en la posición 297 de modo que el residuo de asparagina natural en esa posición se reemplaza con otro aminoácido que interfiere con la glucosilación en esa posición.
- 65 En un modo de realización, la función efectora se reduce o elimina por al menos una modificación de la región Fc. En un modo de realización, la función efectora o función de activación del complemento se reduce o elimina por delección de toda o una porción de la región Fc, o genomanipulando el anticuerpo de modo que no incluya ninguna

región Fc o región distinta de Fc competente para la función efectora o función de activación del complemento. En un modo de realización, la al menos una modificación de la región Fc se selecciona de: una mutación puntual de la región Fc para alterar la unión a uno o más receptores de Fc seleccionada de las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 30 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 y 439; una mutación puntual de la región Fc para alterar la unión a C1q seleccionada de las siguientes posiciones: 270, 322, 329 y 321; eliminación de parte o toda la región Fc, y una mutación puntual en la posición 132 del dominio CH1. En un modo de realización, la modificación es una mutación puntual de la región Fc para alterar la unión a C1q seleccionada de las siguientes posiciones: 270, 322, 329 y 321. En otro modo de realización, la modificación es la eliminación de parte o toda la región Fc. En otro modo de realización, la función desencadenante del complemento se reduce o elimina por delección de toda o una porción de la región Fc, o genomanipulando el anticuerpo de modo que no incluya ninguna región Fc que interaccione con la vía del complemento. En un modo de realización, el anticuerpo se selecciona de un Fab o un anticuerpo monocatenario. En otro modo de realización, la región distinta de Fc del anticuerpo se modifica para reducir o eliminar la activación de la vía del complemento por el anticuerpo. En un modo de realización, la modificación es una mutación puntual de la región CH1 para alterar la unión a C3. En un modo de realización, la mutación puntual está en la posición 132 (véase, por ejemplo, Vidarte *et al.*, J. Biol. Chem. 276 (2001) 38217-38223).

En un aspecto del modo de realización anterior, la afinidad del anticuerpo por TfR se reduce, como se mide en relación con un anticuerpo natural del mismo isotipo que no tiene ninguna afinidad reducida por TfR. En un aspecto de este tipo, el anticuerpo tiene una  $K_D$  o  $CI_{50}$  para TfR de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 100  $\mu$ M.

En un modo de realización, el anticuerpo como se informa en el presente documento tiene su función efectora inactiva. En un modo de realización, el anticuerpo no tiene función efectora. En un modo de realización, el anticuerpo es de la subclase IgG1 humana y tiene las mutaciones L234A, L235A y P329G en ambas cadenas pesadas (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un modo de realización, el anticuerpo es

- a) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG1, o
- b) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG4, o
- c) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG1 con las mutaciones L234A, L235A y P329G,
- d) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG4 con las mutaciones S228P, L235E y opcionalmente P329G,
- e) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG1 con las mutaciones L234A, L235A y P329G en ambas cadenas pesadas y las mutaciones T366W y S354C en una cadena pesada y las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C en la otra cadena pesada respectiva, o
- f) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG4 con las mutaciones S228P y opcionalmente P329G en ambas cadenas pesadas y las mutaciones T366W y S354C en una cadena pesada y las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C en la otra cadena pesada respectiva.

En un aspecto del modo de realización anterior, la invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto del modo de realización anterior, la invención proporciona cualquiera de los anticuerpos anteriores para su uso como medicamento.

En otro aspecto del modo de realización anterior, la invención proporciona el uso de cualquiera de los anticuerpos anteriores en la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno neurológico. En un modo de realización, el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en un trastorno neuropático, una enfermedad neurodegenerativa, cáncer, un trastorno por enfermedad ocular, un trastorno convulsivo, una enfermedad de almacenamiento lisosómico, amiloidosis, una enfermedad vírica o microbiana, isquemia, un trastorno del comportamiento e inflamación del SNC.

En otro aspecto del modo de realización anterior, se proporciona el uso de cualquiera de los anticuerpos anteriores en la fabricación de un medicamento para transportar uno o más compuestos a través de la BHE.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-receptor de transferrina de acuerdo con cualquiera de los aspectos y modos de realización anteriores puede incorporar cualquiera de los rasgos característicos, individualmente o en combinación, como se describe en las secciones 1-5 a continuación:

## 1. Afinidad del anticuerpo

En un modo de realización, Kd se mide por un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA). En un modo de realización, se realiza un RIA con la versión de Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno. Por ejemplo, se mide la afinidad de unión en solución de los Fab por el antígeno equilibrando los Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (<sup>125</sup>I) en presencia de una serie de valoraciones de antígeno no marcado, capturando, a continuación, el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen, Y. *et al.*, J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren placas de múltiples pocillos MICROTITER® (Thermo Scientific) durante la noche con 5 pg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) con carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6) y posteriormente se bloquean con seroalbúmina bovina al 2 % (p/v) en PBS durante de dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc, n.º 269620), se mezcla [<sup>125</sup>I]-antígeno 100 pM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, consecuente con la evaluación de un anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta L.G. *et al.*, Cancer Res. 57 (1997) 4593-4599). A continuación, el Fab de interés se incuba durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo más largo (por ejemplo, de aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcanza el equilibrio. Después de esto, se transfieren las mezclas a la placa de captura para su incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). A continuación, se retira la solución y la placa se lava ocho veces con polisorbato 20 (TWEEN-20®) al 0,1 % en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden 150 µl/pocillo de centelleador (MICROSCINT-20™; Packard) y se cuentan las placas en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Se eligen concentraciones de cada Fab que den menos de o igual a un 20 % de unión máxima para su uso en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otro modo de realización, Kd se mide usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial en BIACORE®. Por ejemplo, se realiza un ensayo usando un BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips CM5 con antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). En un modo de realización, los chips de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore, Inc.) se activan con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, hasta 5 µg/ml (~ 0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Tras la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie en dos veces de Fab (de 0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo polisorbato 20 (TWEEN-20™) (PBST) al 0,05 % a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Se calculan las tasas de asociación ( $k_{as}$ ) y las tasas de disociación ( $k_{dis}$ ) usando un simple modelo de unión uno a uno de Langmuir (programa informático de evaluación de BIACORE®, versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (KD) se calcula como la proporción  $k_{dis}/k_{as}$  (véase, por ejemplo, Chen, Y. *et al.*, J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881). Si la tasa de asociación sobrepasa  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  por el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces, se puede determinar la tasa de asociación usando una técnica de extinción fluorescente que mide el incremento o disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo antiantígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ de la serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

## 2. Fragmentos de anticuerpo

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, Fv y scFv, y otros fragmentos descritos a continuación. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson, P. J. *et al.*, Nat. Med. 9 (2003) 129-134. Para una revisión de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Plueckthun, A., en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore (eds), Springer-Verlag, New York (1994), pp. 269-315; véanse también los documentos WO 93/16185; US 5.571.894 y US 5.587.458. Para un análisis de los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> que comprenden residuos de epítipo de unión a receptor de rescate y que tienen una semivida *in vivo* incrementada véase el documento US 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véanse, por ejemplo, los documentos EP 0 404 097; WO 1993/01161; Hudson, P. J. *et al.*, Nat. Med. 9 (2003) 129-134; y Holliger, P. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448. También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson, P. J. *et al.*, Nat. Med. 9 (2003) 129-134.

Los anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpo que comprenden todo o una porción del dominio variable de la cadena pesada o todo o una porción del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En determinados modos de realización, un anticuerpo de un dominio único es un anticuerpo de un dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, el documento US 6.248.516).

Se pueden preparar fragmentos de anticuerpo por diversas técnicas que incluyen, pero sin limitarse a, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como producción por células huésped recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en el presente documento.

### 5 3. Anticuerpos quiméricos y humanizados

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo quimérico. Determinados anticuerpos quiméricos se describen, por ejemplo, en el documento US 4.816.567; y Morrison, S.L. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En otro ejemplo, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo "con clase cambiada" en el que se ha cambiado la clase o subclase de la del anticuerpo original. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

En determinados modos de realización, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente, se humaniza un anticuerpo no humano para reducir la inmunogenicidad con respecto a los seres humanos, mientras que se retienen la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano original. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR (o porciones de las mismas), se derivan de un anticuerpo no humano y las FR (o porciones de las mismas) se derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante humana. En algunos modos de realización se sustituyen algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado por los residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que se derivan los residuos de HVR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los procedimientos de preparación de los mismos se revisan, por ejemplo, en Almagro, J.C. y Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633, y se describen además, por ejemplo, en Riechmann, I. *et al.*, Nature 332 (1988) 323-329; Queen, C. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033; los documentos US 5. 821.337, US 7.527.791, US 6.982.321 y US 7.087.409; Kashmiri, S.V. *et al.*, Methods 36 (2005) 25-34 (que describen el injerto de regiones determinantes de la especificidad (SDR)); Padlan, E.A., Mol. Immunol. 28 (1991) 489-498 (que describe el "rebarnizado"); Dall'Acqua, W.F. *et al.*, Methods 36 (2005) 43-60 (que describen el "barajado de FR"); y Osbourn, J. *et al.*, Methods 36 (2005) 61-68 y Klimka, A. *et al.*, Br. J. Cancer 83 (2000) 252-260 (que describen el enfoque de "selección guiada" con respecto al barajado de FR).

Las regiones estructurales humanas que se pueden usar para la humanización incluyen, pero no se limitan a: regiones estructurales seleccionadas usando el procedimiento de "mejor ajuste" (véase, por ejemplo, Sims, M.J. *et al.*, J. Immunol. 151 (1993) 2296-2308); regiones estructurales derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de la cadena ligera o pesada (véanse, por ejemplo, Carter, P. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289; y Presta, L.G. *et al.*, J. Immunol. 151 (1993) 2623-2632); regiones estructurales maduras (mutadas somáticamente) humanas o regiones estructurales de la estirpe germinal humanas (véase, por ejemplo, Almagro, J.C. y Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633); y regiones estructurales derivadas del cribado de colecciones de FR (véanse, por ejemplo, Baca, M. *et al.*, J. Biol. Chem. 272 (1997) 10678-10684 y Rosok, M.J. *et al.*, J. Biol. Chem. 271 (1996) 22611-22618).

### 45 4. Anticuerpos multiespecíficos

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. En determinados modos de realización, una de las especificidades de unión es para el receptor de transferrina y la otra es para cualquier otro antígeno. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan el receptor de transferrina. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

Las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, la coexpresión recombinante de dos pares cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (véanse Milstein, C. y Cuello, A.C., Nature 305 (1983) 537-540, documento WO 93/08829, y Traunecker, A. *et al.*, EMBO J. 10 (1991) 3655-3659), y genomanipulación de "botón en ojal" (véase, por ejemplo, el documento US 5.731.168). También se pueden preparar anticuerpos multiespecíficos genomanipulando los efectos de conducción electrostática para preparar moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpo (documento WO 2009/089004); reticular dos o más anticuerpos o fragmentos (véanse, por ejemplo, documento US 4.676.980, y Brennan, M. *et al.*, Science 229 (1985) 8183); usando cremalleras de leucinas para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny, S.A. *et al.*, J. Immunol. 148 (1992) 15471553); usando la tecnología de "diacuerpos" para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico (véase, por ejemplo, Holliger, P. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 64446448); y usar dímeros de Fv monocatenarios (scFv) (véase, por ejemplo, Gruber, M. *et al.*, J. Immunol. 152 (1994) 53685374); y preparar anticuerpos trispecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt, A. *et al.*, J.

Immunol. 147 (1991) 6069).

Los anticuerpos genomanipulados con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluyendo los "anticuerpos pulpo", también se incluyen en el presente documento (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576).

El anticuerpo o fragmento en el presente documento también incluye un "Fab de doble acción" o "DAF" que comprende un sitio de unión a antígeno que se une al receptor de transferrina, así como a otro antígeno diferente (véase el documento US 2008/0069820, por ejemplo).

El anticuerpo o fragmento en el presente documento también incluye los anticuerpos multiespecíficos descritos en los documentos WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254, WO 2010/112193, WO 2010/115589, WO 2010/136172, WO 2010/145792 y WO 2010/145793.

En un modo de realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, el anticuerpo anti-receptor de transferrina es un anticuerpo biespecífico.

Un aspecto de la invención es un anticuerpo bivalente, biespecífico que comprende

a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de un anticuerpo que se unen específicamente a un primer antígeno, y

b) una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada de un anticuerpo que se unen específicamente a un segundo antígeno, en el que los dominios variables VL y VH de la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada se reemplazan entre sí,

en el que el primer antígeno o el segundo antígeno es el receptor de transferrina humano y en el que la cadena ligera y la cadena pesada que se unen específicamente al receptor de transferrina humano comprenden un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37.

El anticuerpo en a) no contiene una modificación como se informa en b) y la cadena pesada y la cadena ligera en a) son cadenas aisladas.

En el anticuerpo en b)

dentro de la cadena ligera

el dominio variable de la cadena ligera VL se reemplaza por el dominio variable de la cadena pesada VH de dicho anticuerpo,

y

dentro de la cadena pesada

el dominio variable de la cadena pesada VH se reemplaza por el dominio variable de la cadena ligera VL de dicho anticuerpo.

En un modo de realización

i) en el dominio constante CL de la primera cadena ligera en a) el aminoácido en la posición 124 (numeración de acuerdo con Kabat) se sustituye por un aminoácido cargado positivamente, y en el que en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada en a) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituyen por un aminoácido cargado negativamente.

o

ii) en el dominio constante CL de la segunda cadena ligera en b) el aminoácido en la posición 124 (numeración de acuerdo con Kabat) se sustituye por un aminoácido cargado positivamente, y en el que en el dominio constante CH1 de la segunda cadena pesada en b) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) se sustituyen por un aminoácido cargado negativamente.

En un modo de realización preferente

i) en el dominio constante CL de la primera cadena ligera en a) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) (en un modo de realización preferente independientemente por lisina (K) o arginina (R)), y en el que en el dominio constante CH1

de la primera cadena pesada en a) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituyen independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat),

5 o

ii) en el dominio constante CL de la segunda cadena ligera en b) el aminoácido en la posición 124 se sustituye independientemente por lisina (K), arginina (R) o histidina (H) (numeración de acuerdo con Kabat) (en un modo de realización preferente independientemente por lisina (K) o arginina (R)), y en el que en el dominio constante CH1 de la segunda cadena pesada en b) el aminoácido en la posición 147 o el aminoácido en la posición 213 se sustituye independientemente por ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

15 En un modo de realización, en el dominio constante CL de la segunda cadena pesada los aminoácidos en la posición 124 y 123 se sustituyen por K (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un modo de realización en el dominio constante CH1 de la segunda cadena ligera, los aminoácidos en la posición 147 y 213 se sustituyen por E (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

20 En un modo de realización preferente, en el dominio constante CL de la primera cadena ligera los aminoácidos en la posición 124 y 123 se sustituyen por K, y en el dominio constante CH1 de la primera cadena pesada los aminoácidos en la posición 147 y 213 se sustituyen por E (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

25 En un modo de realización en el dominio constante CL de la segunda cadena pesada, los aminoácidos en la posición 124 y 123 se sustituyen por K, y en el que en el dominio constante CH1 de la segunda cadena ligera los aminoácidos en la posición 147 y 213 se sustituyen por E, y en el dominio variable VL de la primera cadena ligera, el aminoácido en la posición 38 se sustituye por K, en el dominio variable VH de la primera cadena pesada, el aminoácido en la posición 39 se sustituye por E, en el dominio variable VL de la segunda cadena pesada, el aminoácido en la posición 38 se sustituye por K, y en el dominio variable VH de la segunda cadena ligera, el aminoácido en la posición 39 se sustituye por E (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

30 Un aspecto de la invención es un anticuerpo bivalente, biespecífico que comprende

35 a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de un anticuerpo que se unen específicamente a un primer antígeno, y

40 b) una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada de un anticuerpo que se unen específicamente a un segundo antígeno, en el que los dominios variables VL y VH de la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada se reemplazan entre sí, y en el que los dominios constantes CL y CH1 de la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada se reemplazan entre sí,

45 en el que el primer antígeno o el segundo antígeno es el receptor de transferrina humano y en el que la cadena ligera y la cadena pesada que se unen específicamente al receptor de transferrina humano comprenden un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37.

El anticuerpo en a) no contiene una modificación como se informa en b) y la cadena pesada y la cadena ligera en a) son cadenas aisladas.

50 En el anticuerpo en b)

dentro de la cadena ligera

55 el dominio variable de la cadena ligera VL se reemplaza por el dominio variable de la cadena pesada VH de dicho anticuerpo, y el dominio constante de la cadena ligera CL se reemplaza por el dominio constante de la cadena pesada CH1 de dicho anticuerpo;

y

60 dentro de la cadena pesada

el dominio variable de la cadena pesada VH se reemplaza por el dominio variable de la cadena ligera VL de dicho anticuerpo, y el dominio constante de la cadena pesada CH1 se reemplaza por el dominio constante de la cadena ligera CL de dicho anticuerpo.

65 Un aspecto de la invención es un anticuerpo bivalente, biespecífico que comprende

- a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de un anticuerpo que se unen específicamente a un primer antígeno, y
- 5 b) una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada de un anticuerpo que se unen específicamente a un segundo antígeno, en el que los dominios constante CL y CH1 de la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada se reemplazan entre sí,
- 10 en el que el primer antígeno o el segundo antígeno es el receptor de transferrina humano y en el que la cadena ligera y la cadena pesada que se unen específicamente al receptor de transferrina humano comprenden un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37.
- El anticuerpo en a) no contiene una modificación como se informa en b) y la cadena pesada y la cadena ligera en a) son cadenas aisladas.
- 15 En el anticuerpo en b)
- dentro de la cadena ligera
- 20 el dominio constante de la cadena ligera CL se reemplaza por el dominio constante de la cadena pesada CH1 de dicho anticuerpo;
- y dentro de la cadena pesada
- 25 el dominio constante de la cadena pesada CH1 se reemplaza por el dominio constante de la cadena ligera CL de dicho anticuerpo.
- Un aspecto de la invención es un anticuerpo multiespecífico que comprende
- 30 a) un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno y que consiste en dos cadenas pesadas de anticuerpo y dos cadenas ligeras de anticuerpo, y
- 35 b) uno, dos, tres o cuatro fragmentos Fab monocatenarios que se unen específicamente a de uno a cuatro antígenos adicionales (es decir, un segundo y/o tercer y/o cuarto y/o quinto antígeno, preferentemente que se unen específicamente a otro antígeno adicional, es decir, un segundo antígeno),
- 40 en el que dichos fragmentos Fab monocatenarios en b) se fusionan con dicho anticuerpo de longitud completa en a) por medio de un conector peptídico en el extremo C o N de la cadena pesada o ligera de dicho anticuerpo de longitud completa,
- 45 en el que el primer antígeno o uno de los otros antígenos es el receptor de transferrina humano y en el que el sitio de unión que se une específicamente al receptor de transferrina humano comprende un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37.
- En un modo de realización, uno o dos fragmentos Fab monocatenarios idénticos que se unen a un segundo antígeno se fusionan a dicho anticuerpo de longitud completa por medio de un conector peptídico en el extremo C de las cadenas pesadas o ligeras de dicho anticuerpo de longitud completa.
- 50 En un modo de realización, uno o dos fragmentos Fab monocatenarios idénticos que se unen a un segundo antígeno se fusionan a dicho anticuerpo de longitud completa por medio de un conector peptídico en el extremo C de las cadenas pesadas de dicho anticuerpo de longitud completa.
- 55 En un modo de realización, uno o dos fragmentos Fab monocatenarios idénticos que se unen a un segundo antígeno se fusionan a dicho anticuerpo de longitud completa por medio de un conector peptídico en el extremo C de las cadenas ligeras de dicho anticuerpo de longitud completa.
- 60 En un modo de realización, dos fragmentos Fab monocatenarios idénticos que se unen a un segundo antígeno se fusionan a dicho anticuerpo de longitud completa por medio de un conector peptídico en el extremo C de cada cadena pesada o ligera de dicho anticuerpo de longitud completa.
- 65 En un modo de realización, dos fragmentos Fab monocatenarios idénticos que se unen a un segundo antígeno se fusionan a dicho anticuerpo de longitud completa por medio de un conector peptídico en el extremo C de cada cadena ligera de dicho anticuerpo de longitud completa.

Un aspecto de la invención es un anticuerpo biespecífico trivalente que comprende

a) un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno y que consiste en dos cadenas pesadas de anticuerpo y dos cadenas ligeras de anticuerpo,

b) un primer polipéptido que consiste en

ba) un dominio variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpo,

o

bb) un dominio variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpo y un dominio constante 1 (CH1) de anticuerpo,

en el que dicho primer polipéptido se fusiona con el extremo N de su dominio VH por medio de un conector peptídico al extremo C de una de las dos cadenas pesadas de dicho anticuerpo de longitud completa,

c) un segundo polipéptido que consiste en

ca) un dominio variable de la cadena ligera (VL) de anticuerpo,

o

cb) un dominio variable de la cadena ligera (VL) de anticuerpo y un dominio constante de la cadena ligera (CL) de anticuerpo,

en el que dicho segundo polipéptido se fusiona con el extremo N del dominio VL por medio de un conector peptídico al extremo C de la otra de las dos cadenas pesadas de dicho anticuerpo de longitud completa,

y

en el que el dominio variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpo del primer polipéptido y el dominio variable de la cadena ligera (VL) de anticuerpo del segundo polipéptido juntos forman un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un segundo antígeno,

y

en el que el primer antígeno o el segundo antígeno es el receptor de transferrina humano y en el que el sitio de unión que se une específicamente al receptor de transferrina humano comprende un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37.

En un modo de realización, el dominio variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpo del polipéptido en b) y el dominio variable de la cadena ligera (VL) de anticuerpo del polipéptido en c) se enlazan y se estabilizan por medio de un puente disulfuro intercatenario por la introducción de un enlace disulfuro entre las siguientes posiciones:

i) posición 44 del dominio variable de la cadena pesada a la posición 100 del dominio variable de la cadena ligera, o

ii) posición 105 del dominio variable de la cadena pesada a la posición 43 del dominio variable de la cadena ligera, o

iii) posición 101 del dominio variable de la cadena pesada a la posición 100 del dominio variable de la cadena ligera (numeración siempre de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Las técnicas para introducir puentes disulfuro no naturales para la estabilización se describen, por ejemplo, en el documento WO 94/029350, Rajagopal, V., *et al.*, Prot. Eng. (1997) 1453-59; Kobayashi, H., *et al.*, Nuclear Medicine & Biology, vol. 25, (1998) 387-393; o Schmidt, M., *et al.*, Oncogene (1999) 18 1711-1721. En un modo de realización, el enlace disulfuro opcional entre los dominios variables de los polipéptidos en b) y c) está entre la posición 44 del dominio variable de la cadena pesada y la posición 100 del dominio variable de la cadena ligera. En un modo de realización, el enlace disulfuro opcional entre los dominios variables de los polipéptidos en b) y c) está entre la posición 105 del dominio variable de la cadena pesada y la posición 43 del dominio variable de la cadena ligera (numeración siempre de acuerdo con Kabat). En un modo de realización, es preferente un anticuerpo biespecífico trivalente sin dicha estabilización con disulfuro opcional entre los dominios variables VH y VL de los fragmentos Fab monocatenarios.

Un aspecto de la invención es un anticuerpo triespecífico o tetraespecífico, que comprende



a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno, y

5 b) una segunda cadena ligera (modificada) y una segunda cadena pesada (modificada) de un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un segundo antígeno, en el que los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí, y/o en el que los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí, y

10 c) en el que uno a cuatro péptidos de unión a antígeno que se unen específicamente a otro u otros dos antígenos (es decir, a un tercer y/o cuarto antígeno) se fusionan por medio de un conector peptídico al extremo C o N de las cadenas ligeras o cadenas pesadas de a) y/o b),

15 en el que el primer antígeno o el segundo antígeno o uno de los otros antígenos es el receptor de transferrina humano y en el que el sitio de unión que se une específicamente al receptor de transferrina humano comprende un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37.

20 El anticuerpo en a) no contiene una modificación como se informa en b) y la cadena pesada y la cadena ligera en a) son cadenas aisladas.

En un modo de realización, el anticuerpo trispecífico o tetraespecífico comprende en c) uno o dos péptidos de unión a antígeno que se unen específicamente a uno o dos antígenos adicionales.

25 En un modo de realización, los péptidos de unión a antígeno se seleccionan del grupo de un fragmento scFv y un fragmento scFab.

En un modo de realización, los péptidos de unión a antígeno son fragmentos scFv.

30 En un modo de realización, los péptidos de unión a antígeno son fragmentos scFab.

En un modo de realización, los péptidos de unión a antígeno se fusionan al extremo C de las cadenas pesadas de a) y/o b).

35 En un modo de realización, el anticuerpo trispecífico o tetraespecífico comprende en c) uno o dos péptidos de unión a antígeno que se unen específicamente a un antígeno adicional.

40 En un modo de realización, el anticuerpo trispecífico o tetraespecífico comprende en c) dos péptidos de unión a antígeno idénticos que se unen específicamente a un tercer antígeno. En un modo de realización preferente, dichos dos péptidos de unión a antígeno idénticos se fusionan ambos por medio del mismo conector peptídico al extremo C de las cadenas pesadas de a) y b). En un modo de realización preferente, los dos péptidos de unión a antígeno idénticos son un fragmento scFv o bien un fragmento scFab.

45 En un modo de realización, el anticuerpo trispecífico o tetraespecífico comprende en c) dos péptidos de unión a antígeno que se unen específicamente a un tercer y un cuarto antígeno. En un modo de realización, dichos dos péptidos de unión a antígeno se fusionan ambos por medio del mismo conector peptídico al extremo C de las cadenas pesadas de a) y b). En un modo de realización preferente, dichos dos péptidos de unión a antígeno son un fragmento scFv o bien un fragmento scFab.

50 Un aspecto de la invención es un anticuerpo tetravalente biespecífico que comprende

a) dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas de un anticuerpo, que se unen específicamente a un primer antígeno (y comprenden dos fragmentos Fab),

55 b) dos fragmentos Fab adicionales de un anticuerpo, que se unen específicamente a un segundo antígeno, en el que dichos fragmentos Fab adicionales se fusionan ambos por medio de un conector peptídico a los extremos C o bien N de las cadenas pesadas de a),

y

60 en el que en los fragmentos Fab se realizaron las siguientes modificaciones

i) en ambos fragmentos Fab de a), o en ambos fragmentos Fab de b), los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí, y/o los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí,

65 o

ii) en ambos fragmentos Fab de a) los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí, y los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí,

y

5

en ambos fragmentos Fab de b) los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí, o los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí,

o

10

iii) en ambos fragmentos Fab de a) los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí, o los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí,

y

15

en ambos fragmentos Fab de b) los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí, y los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí,

o

20

iv) en ambos fragmentos Fab de a) los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí, y en ambos fragmentos Fab de b) los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí,

o

25

en ambos fragmentos Fab de a) los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí, y en ambos fragmentos Fab de b) los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí,

en el que el primer antígeno o el segundo antígeno es el receptor de transferrina humano y en el que el sitio de unión que se une específicamente al receptor de transferrina humano comprende un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37.

30

En un modo de realización, dichos fragmentos Fab adicionales se fusionan ambos por medio de un conector peptídico a los extremos C de las cadenas pesadas de a) o bien a los extremos N de las cadenas pesadas de a).

35

En un modo de realización, dichos fragmentos Fab adicionales se fusionan ambos por medio de un conector peptídico a los extremos C de las cadenas pesadas de a).

En un modo de realización, dichos fragmentos Fab adicionales se fusionan ambos por medio de un conector peptídico a los extremos N de las cadenas pesadas de a).

40

En un modo de realización, en los fragmentos Fab se realizan las siguientes modificaciones:

i) en ambos fragmentos Fab de a), o en ambos fragmentos Fab de b), los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí,

45

y/o

los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí.

50

En un modo de realización, en los fragmentos Fab se realizan las siguientes modificaciones:

i) en ambos fragmentos Fab de a) los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí,

55

y/o

los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí.

En un modo de realización, en los fragmentos Fab se realizan las siguientes modificaciones:

60

i) en ambos fragmentos Fab de a) los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí.

En un modo de realización, en los fragmentos Fab se realizan las siguientes modificaciones:

65

i) en ambos fragmentos Fab de b) los dominios variables VL y VH se reemplazan entre sí,

y/o

los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí.

5 En un modo de realización, en los fragmentos Fab se realizan las siguientes modificaciones:

i) en ambos fragmentos Fab de b) los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí.

Un aspecto de la invención es un anticuerpo tetravalente biespecífico que comprende:

10

a) una cadena pesada (modificada) de un primer anticuerpo, que se une específicamente a un primer antígeno y comprende un primer par de dominios VH-CH1, en el que al extremo C de dicha cadena pesada se fusiona por medio de un conector peptídico el extremo N de un segundo par de dominios VH-CH1 de dicho primer anticuerpo,

15

b) dos cadenas ligeras de dicho primer anticuerpo de a),

20

c) una cadena pesada (modificada) de un segundo anticuerpo, que se une específicamente a un segundo antígeno y comprende un primer par de dominios VH-CL, en el que al extremo C de dicha cadena pesada se fusiona el extremo N de un segundo par de dominios VH-CL de dicho segundo anticuerpo por medio de un conector peptídico, y

20

d) dos cadenas ligeras (modificadas) de dicho segundo anticuerpo de c), comprendiendo cada una un par de dominios CL-CH1,

25

en el que el primer antígeno o el segundo antígeno es el receptor de transferrina humano y en el que el sitio de unión que se une específicamente al receptor de transferrina humano comprende un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37.

Un aspecto de la invención es un anticuerpo biespecífico que comprende

30

a) la cadena pesada y la cadena ligera de un primer anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno, y

35

b) la cadena pesada y la cadena ligera de un segundo anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un segundo antígeno, en el que el extremo N de la cadena pesada está conectado al extremo C de la cadena ligera por medio de un conector peptídico,

40

en el que el primer antígeno o el segundo antígeno es el receptor de transferrina humano y en el que la cadena ligera y la cadena pesada que se unen específicamente al receptor de transferrina humano comprenden un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37.

El anticuerpo en a) no contiene una modificación como se informa en b) y la cadena pesada y la cadena ligera son cadenas aisladas.

45

Un aspecto de la invención es un anticuerpo biespecífico que comprende

50

a) un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno y que consiste en dos cadenas pesadas de anticuerpo y dos cadenas ligeras de anticuerpo, y

50

b) un fragmento Fv que se une específicamente a un segundo antígeno que comprende un dominio VH<sup>2</sup> y un dominio VL<sup>2</sup>, en el que ambos dominios están conectados entre sí por medio de un puente disulfuro,

55

en el que solo el dominio VH<sup>2</sup> o bien el dominio VL<sup>2</sup> se fusiona por medio de un conector peptídico a la cadena pesada o ligera del anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno,

55

en el que el primer antígeno o el segundo antígeno es el receptor de transferrina humano y en el que el sitio de unión que se une específicamente al receptor de transferrina humano comprende un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37.

60

En el biespecífico, las cadenas pesadas y las cadenas ligeras en a) son cadenas aisladas.

En un modo de realización, el otro del dominio VH<sup>2</sup> o el dominio VL<sup>2</sup> no está fusionado por medio de un conector peptídico a la cadena pesada o ligera del anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno.

65

En todos los aspectos como se informa en el presente documento, la primera cadena ligera comprende un dominio

VL y un dominio CL y la primera cadena pesada comprende un dominio VH, un dominio CH1, una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3.

Un aspecto de la invención es un anticuerpo trivalente biespecífico que comprende

- a) dos fragmentos Fab que se unen específicamente a un primer antígeno,
- b) un fragmento CrossFab que se une específicamente a un segundo antígeno en el que el dominio CH1 y el CL se intercambian entre sí,
- c) una región Fc que comprende una primera cadena pesada de la región Fc y una segunda cadena pesada de la región Fc,

en el que el extremo C de los dominios CH1 de los dos fragmentos Fab está conectado al extremo N de los polipéptidos de la región Fc con las cadenas pesadas, y

en el que el extremo C del dominio CL del fragmento CrossFab está conectado al extremo N del dominio VH de uno de los fragmentos Fab, y

en el que el primer antígeno o el segundo antígeno es el receptor de transferrina humano y en el que el sitio de unión que se une específicamente al receptor de transferrina humano comprende un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37.

Un aspecto de la invención es un anticuerpo trivalente biespecífico que comprende

- a) dos fragmentos Fab que se unen específicamente a un primer antígeno,
- b) un fragmento CrossFab que se une específicamente a un segundo antígeno en el que el dominio CH1 y el CL se intercambian entre sí,
- c) una región Fc que comprende una primera cadena pesada de la región Fc y una segunda cadena pesada de la región Fc,

en el que el extremo C del dominio CH1 del primer fragmento Fab está conectado al extremo N de uno de los polipéptidos de la región Fc con las cadenas pesadas y el extremo C del dominio CL del fragmento CrossFab está conectado al extremo N del otro polipéptido de la región Fc con las cadenas pesadas, y

en el que el extremo C del dominio CH1 del segundo fragmento Fab está conectado al extremo N del dominio VH del primer fragmento Fab o al extremo N del dominio VH del fragmento CrossFab, y

en el que el primer antígeno o el segundo antígeno es el receptor de transferrina humano y en el que el sitio de unión que se une específicamente al receptor de transferrina humano comprende un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37.

Un aspecto de la invención es un anticuerpo biespecífico que comprende

- a) un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno y que consiste en dos cadenas pesadas de anticuerpo y dos cadenas ligeras de anticuerpo, y
- b) un fragmento Fab que se une específicamente a un segundo antígeno que comprende un dominio VH<sup>2</sup> y un dominio VL<sup>2</sup> que comprende un fragmento de la cadena pesada y un fragmento de la cadena ligera, en el que

dentro del fragmento de la cadena ligera

el dominio variable de la cadena ligera VL<sup>2</sup> se reemplaza por el dominio variable de la cadena pesada VH<sup>2</sup> de dicho anticuerpo,

y

dentro del fragmento de la cadena pesada

el dominio variable de la cadena pesada VH<sup>2</sup> se reemplaza por el dominio variable de la cadena ligera VL<sup>2</sup> de dicho anticuerpo

en el que el fragmento Fab de la cadena pesada se inserta entre el dominio CH1 de una de las cadenas pesadas del anticuerpo de longitud completa y la región Fc respectiva del anticuerpo de longitud completa, y el extremo N

del fragmento Fab de la cadena ligera se conjuga con el extremo C de la cadena ligera del anticuerpo de longitud completa que se empareja con la cadena pesada del anticuerpo de longitud completa en el que se ha insertado el fragmento Fab de la cadena pesada, y

5 en el que el primer antígeno o el segundo antígeno es el receptor de transferrina humano y en el que el sitio de unión que se une específicamente al receptor de transferrina humano comprende un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37.

Un aspecto de la invención es un anticuerpo biespecífico que comprende

10 a) un anticuerpo de longitud completa que se une específicamente a un primer antígeno y que consiste en dos cadenas pesadas de anticuerpo y dos cadenas ligeras de anticuerpo, y

15 b) un fragmento Fab que se une específicamente a un segundo antígeno que comprende un dominio VH<sup>2</sup> y un dominio VL<sup>2</sup> que comprende un fragmento de la cadena pesada y un fragmento de la cadena ligera, en el que

dentro del fragmento de la cadena ligera

20 el dominio variable de la cadena ligera VL<sup>2</sup> se reemplaza por el dominio variable de la cadena pesada VH<sup>2</sup> de dicho anticuerpo,

y

25 dentro del fragmento de la cadena pesada

el dominio variable de la cadena pesada VH<sup>2</sup> se reemplaza por el dominio variable de la cadena ligera VL<sup>2</sup> de dicho anticuerpo

30 en el que el extremo C del fragmento de la cadena pesada del fragmento Fab se conjuga con el extremo N de una de las cadenas pesadas del anticuerpo de longitud completa y el extremo C del fragmento de la cadena ligera del fragmento Fab se conjuga con el extremo N de la cadena ligera del anticuerpo de longitud completa que se empareja con la cadena pesada del anticuerpo de longitud completa con el que se conjuga el fragmento de la cadena pesada del fragmento Fab, y

35 en el que el primer antígeno o el segundo antígeno es el receptor de transferrina humano y en el que el sitio de unión que se une específicamente al receptor de transferrina humano comprende un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37.

40 En un modo de realización de todos los aspectos, el anticuerpo como se informa en el presente documento es un anticuerpo multiespecífico que requiere la heterodimerización de al menos dos polipéptidos de cadena pesada, y en el que el anticuerpo se une específicamente al receptor de transferrina humano y a un segundo antígeno receptor de transferrina no humano.

45 Se han descrito varios enfoques para modificaciones de CH3 para respaldar la heterodimerización, por ejemplo, en los documentos WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291. Típicamente, en los enfoques conocidos en la técnica, el dominio CH3 de la primera cadena pesada y el dominio CH3 de la segunda cadena pesada están genomanipulados de manera complementaria de modo que la cadena pesada que comprende un dominio CH3 genomanipulado ya no se pueda homodimerizar con otra cadena pesada de la misma estructura (por ejemplo, una primera cadena pesada con CH3 genomanipulado ya no se puede homodimerizar con otra primera cadena pesada con CH3 genomanipulado; y una segunda cadena pesada con CH3 genomanipulado ya no se puede homodimerizar con otra segunda cadena pesada con CH3 genomanipulado). De este modo, la cadena pesada que comprende un dominio CH3 genomanipulado se ve forzada a heterodimerizarse con otra cadena pesada que comprende el dominio CH3, que está genomanipulado de manera complementaria. Para este modo de realización de la invención, el dominio CH3 de la primera cadena pesada y el dominio CH3 de la segunda cadena pesada están genomanipulados de manera complementaria por sustituciones aminoacídicas, de modo que la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada se ven forzadas a heterodimerizarse, mientras que la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada ya no se pueden homodimerizar (por ejemplo, por motivos estéricos).

60 Los diferentes enfoques para respaldar la heterodimerización de cadenas pesadas conocidos en la técnica, que se citaron e incluyeron anteriormente, se contemplan como diferentes alternativas usadas en un anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la invención, que comprende una "región Fab no cruzada" derivada de un primer anticuerpo, que se une específicamente a un primer antígeno, y una "región Fab cruzada" derivada de un segundo anticuerpo, que se une específicamente a un segundo antígeno, en combinación con las sustituciones aminoacídicas particulares descritas anteriormente para la invención.

Los dominios CH3 del anticuerpo multiespecífico como se informa en el presente documento se pueden alterar por la tecnología de "botón en ojal" que se describe en detalle con varios ejemplos, por ejemplo, en el documento WO 96/027011, Ridgway, J.B., *et al.*, Protein Eng. 9 (1996) 617-621; y Merchant, A.M., *et al.*, Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681. En este procedimiento, las superficies de interacción de los dos dominios CH3 se alteran para incrementar la heterodimerización de ambas cadenas pesadas que contienen estos dos dominios CH3. Cada uno de los dos dominios CH3 (de las dos cadenas pesadas) puede ser el "botón", mientras que el otro es el "ojal". La introducción de un puente disulfuro estabiliza además los heterodímeros (Merchant, A.M., *et al.*, Nature Biotech. 16 (1998) 677681, Atwell, S., *et al.* J. Mol. Biol. 270 (1997) 2635) e incrementa el rendimiento.

En un modo de realización preferente, el anticuerpo multiespecífico como se informa en el presente documento comprende una mutación T366W en el dominio CH3 de la "cadena de botones" y mutaciones T366S, L368A, Y407V en el dominio CH3 de la "cadena de ojal" (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). También se puede usar un puente disulfuro intercatenario adicional entre los dominios CH3 (Merchant, A.M., *et al.*, Nature Biotech. 16 (1998) 677681), por ejemplo, introduciendo una mutación Y349C en el dominio CH3 de la "cadena de botones" y una mutación E356C o una mutación S354C en el dominio CH3 de la "cadena de ojal". Por tanto, en otro modo de realización preferente, el anticuerpo multiespecífico como se informa en el presente documento comprende las mutaciones Y349C y T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones E356C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3 o el anticuerpo multiespecífico como se informa en el presente documento comprende las mutaciones Y349C y T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones S354C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3 (la mutación Y349C adicional en un dominio CH3 y la mutación adicional E356C o S354C en el otro dominio CH3 formando un puente disulfuro intercatenario) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Pero también se pueden usar de forma alternativa o adicionalmente otras tecnologías de botón en ojal, como se describe por el documento EP 1 870 459A1. En un modo de realización, el anticuerpo multiespecífico como se informa en el presente documento comprende las mutaciones R409D y K370E en el dominio CH3 de la "cadena de botones" y las mutaciones D399K y E357K en el dominio CH3 de la "cadena de ojal" (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un modo de realización, el anticuerpo multiespecífico descrito en el presente documento comprende una mutación T366W en el dominio CH3 de la "cadena de botones" y las mutaciones T366S, L368A e Y407V en el dominio CH3 de la "cadena de ojal" y adicionalmente las mutaciones R409D y K370E en el dominio CH3 de la "cadena de botones" y las mutaciones D399K y E357K en el dominio CH3 de la "cadena de ojal" (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un modo de realización, el anticuerpo multiespecífico como se informa en el presente documento comprende las mutaciones Y349C y T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones S354C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3, o el anticuerpo multiespecífico como se informa en el presente documento comprende las mutaciones Y349C y T366W en uno de los dos dominios CH3 y las mutaciones S354C, T366S, L368A e Y407V en el otro de los dos dominios CH3 y adicionalmente las mutaciones R409D y K370E en el dominio CH3 de la "cadena de botones" y las mutaciones D399K y E357K en el dominio CH3 de la "cadena de ojal" (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Además de la "tecnología de botón en ojal", otras técnicas para modificar los dominios CH3 de las cadenas pesadas de un anticuerpo multiespecífico para forzar la heterodimerización son conocidas en la técnica. Estas tecnologías, especialmente las descritas en los documentos WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954 y WO 2013/096291 se contemplan en el presente documento como alternativas a la "tecnología de botón en ojal" en combinación con un anticuerpo multiespecífico como se informa en el presente documento.

En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico como se informa en el presente documento, se usa el enfoque descrito en el documento EP 1870459 para respaldar la heterodimerización de la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico. Este enfoque se basa en la introducción de aminoácidos cargados con cargas opuestas en posiciones de aminoácido específicas en la interfase entre los dominios CH3/CH3 entre tanto la primera como la segunda cadena pesada.

En consecuencia, este modo de realización se refiere a un anticuerpo multiespecífico como se informa en el presente documento, en el que en la estructura terciaria del anticuerpo, el dominio CH3 de la primera cadena pesada y el dominio CH3 de la segunda cadena pesada forman una interfase que está localizada entre los respectivos dominios CH3 del anticuerpo, en el que las respectivas secuencias de aminoácidos del dominio CH3 de la primera cadena pesada y el dominio CH3 de la segunda cadena pesada comprenden cada una un conjunto de aminoácidos que está localizado dentro de dicha interfase en la estructura terciaria del anticuerpo, en el que del conjunto de aminoácidos que está localizado en la interfase del dominio CH3 de una cadena pesada, un primer aminoácido se sustituye por un aminoácido cargado positivamente y del conjunto de aminoácidos que está

5 localizado en la interfase del dominio CH3 de la otra cadena pesada, un segundo aminoácido se sustituye por un aminoácido cargado negativamente. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con este modo de realización también se denomina en el presente documento "anticuerpo multiespecífico genomanipulado en CH3(+/-)" (en el que la abreviatura "+/-" representa los aminoácidos con carga opuesta que se introdujeron en los respectivos dominios CH3).

10 En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico genomanipulado en CH3(+/-) como se informa en el presente documento, el aminoácido cargado positivamente se selecciona de K, R y H, y el aminoácido cargado negativamente se selecciona de E o D.

15 En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico genomanipulado en CH3(+/-) como se informa en el presente documento, el aminoácido cargado positivamente se selecciona de K y R, y el aminoácido cargado negativamente se selecciona de E o D.

20 En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico genomanipulado en CH3(+/-) como se informa en el presente documento, el aminoácido cargado positivamente es K y el aminoácido cargado negativamente es E.

25 En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico genomanipulado en CH3(+/-) como se informa en el presente documento en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido R en la posición 409 se sustituye por D y el aminoácido K en la posición se sustituye por E, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, el aminoácido D en la posición 399 se sustituye por K y el aminoácido E en la posición 357 se sustituye por K (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

30 En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico como se informa en el presente documento, se usa el enfoque descrito en el documento WO 2013/157953 para respaldar la heterodimerización de la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico. En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico como se informa en el presente documento, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido T en la posición 366 se sustituye por K, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada el aminoácido L se sustituye en la posición 351 por D (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En otro modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico como se informa en el presente documento, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido T en la posición 366 se sustituye por K y el aminoácido L en la posición 351 se sustituye por K, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, el aminoácido L en la posición 351 se sustituye por D (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

35 En otro modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico como se informa en el presente documento, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido T en la posición 366 se sustituye por K y el aminoácido L en la posición 351 se sustituye por K, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, el aminoácido L en la posición 351 se sustituye por D (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). Adicionalmente, al menos una de las siguientes sustituciones está comprendida en el dominio CH3 de la otra cadena pesada: el aminoácido Y en la posición 349 se sustituye por E, el aminoácido Y en la posición 349 se sustituye por D y el aminoácido L en la posición 368 se sustituye por E (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un modo de realización, el aminoácido L en la posición 368 se sustituye por E (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

45 En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico como se informa en el presente documento, se usa el enfoque descrito en el documento WO 2012/058768 para respaldar la heterodimerización de la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico. En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico como se informa en el presente documento, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido L en la posición 351 se sustituye por Y y el aminoácido Y en la posición 407 se sustituye por A, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, el aminoácido T en la posición 366 se sustituye por A y el aminoácido K en la posición 409 se sustituye por F (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En otro modo de realización, además de las sustituciones mencionadas anteriormente, en el dominio CH3 de la otra cadena pesada se sustituye al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 411 (originalmente T), 399 (originalmente D), 400 (originalmente S), 405 (originalmente F), 390 (originalmente N) y 392 (originalmente K) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). Las sustituciones preferentes son:

55 - sustitución del aminoácido T en la posición 411 por un aminoácido seleccionado de N, R, Q, K, D, E y W (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat),

60 - sustitución del aminoácido D en la posición 399 por un aminoácido seleccionado de R, W, Y y K (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat),

- sustitución del aminoácido S en la posición 400 por un aminoácido seleccionado de E, D, R y K (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat),

65 - sustitución del aminoácido F en la posición 405 por un aminoácido seleccionado de I, M, T, S, V y W (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat);

- sustitución del aminoácido N en la posición 390 por un aminoácido seleccionado de R, K y D (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat), y

5 - sustitución del aminoácido K en la posición 392 por un aminoácido seleccionado de V, M, R, L, F y E (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

10 En otro modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico como se informa en el presente documento (genomanipulado de acuerdo con el documento WO 2012/058768), en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido L en la posición 351 se sustituye por Y y el aminoácido Y en la posición 407 se sustituye por A, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, el aminoácido T en la posición 366 se sustituye por V y el aminoácido K en la posición 409 se sustituye por F (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En otro modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico como se informa en el presente documento, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido Y en la posición 407 se sustituye por A, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada se sustituye el aminoácido T en la posición 366 por A y el aminoácido K en la posición 409 se sustituye por F (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En dicho último modo de realización mencionado anteriormente, en el dominio CH3 de dicha otra cadena pesada, el aminoácido K en la posición 392 se sustituye por E, el aminoácido T en la posición 411 se sustituye por E, el aminoácido D en la posición 399 se sustituye por R y el aminoácido S en la posición 400 se sustituye por R (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

20 En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico como se informa en el presente documento, se usa el enfoque descrito en el documento WO 2011/143545 para respaldar la heterodimerización de la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico. En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico como se informa en el presente documento, las modificaciones aminoacídicas en los dominios CH3 de ambas cadenas pesadas se introducen en las posiciones 368 y/o 409 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

30 En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico como se informa en el presente documento, se usa el enfoque descrito en el documento WO 2011/090762 para respaldar la heterodimerización de la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico. El documento WO 2011/090762 se refiere a modificaciones aminoacídicas de acuerdo con la tecnología de "botón en ojal". En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico genomanipulado en CH3(KiH) como se informa en el presente documento, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido T en la posición 366 se sustituye por W, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada el aminoácido Y en la posición 407 se sustituye por A (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En otro modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico genomanipulado en CH3(KiH) como se informa en el presente documento, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido T en la posición 366 se sustituye por Y, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada el aminoácido Y en la posición 407 se sustituye por T (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

40 En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico como se informa en el presente documento, que es de isotipo IgG2, se usa el enfoque descrito en el documento WO 2011/090762 para respaldar la heterodimerización de la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico.

45 En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico como se informa en el presente documento, se usa el enfoque descrito en el documento WO 2009/089004 para respaldar la heterodimerización de la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico. En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico como se informa en el presente documento, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido K o N en la posición 392 se sustituye por un aminoácido cargado negativamente (en un modo de realización preferente por E o D, en un modo de realización preferente por D), y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, el aminoácido D en la posición 399, el aminoácido E o D en la posición 356 o el aminoácido E en la posición 357 se sustituye por un aminoácido cargado positivamente (en un modo de realización preferente K o R, en un modo de realización preferente por K, en un modo de realización preferente los aminoácidos en las posiciones 399 o 356 se sustituyen por K) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En otro modo de realización, además de las sustituciones mencionadas anteriormente, en el dominio CH3 de la cadena pesada, el aminoácido K o R en la posición 409 se sustituye por un aminoácido cargado negativamente (en un modo de realización preferente por E o D, en un modo de realización preferente por D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). Aún en otro modo de realización, además de o de forma alternativa a las sustituciones mencionadas anteriormente, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el aminoácido K en la posición 439 y/o el aminoácido K en la posición 370 se sustituyen, independientemente el uno del otro, por un aminoácido cargado negativamente (en un modo de realización preferente por E o D, en un modo de realización preferente por D) (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

65 En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico como se informa en el presente documento, se usa el enfoque descrito en el documento WO 2007/147901 para respaldar la heterodimerización de la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico. En un modo de realización de dicho anticuerpo multiespecífico como se informa en el presente documento, en el dominio CH3 de una cadena pesada, el



aminoácido K en la posición 253 se sustituye por E, el aminoácido D en la posición 282 se sustituye por K y el aminoácido K en la posición 322 se sustituye por D, y en el dominio CH3 de la otra cadena pesada, el aminoácido D en la posición 239 se sustituye por K, el aminoácido E en la posición 240 se sustituye por K y el aminoácido K en la posición 292 se sustituye por D (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

5 En un modo de realización de un anticuerpo multiespecífico como se informa en el presente documento, se usa el enfoque descrito en el documento WO 2007/110205 para respaldar la heterodimerización de la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada del anticuerpo multiespecífico.

10 En un modo de realización de todos los aspectos y modos de realización como se informa en el presente documento, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo trispecífico. En un modo de realización preferente, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico.

15 En un modo de realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo bivalente o trivalente. En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo bivalente.

En un modo de realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, el anticuerpo multiespecífico tiene una estructura de dominio constante de un anticuerpo de tipo IgG. En otro modo de realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, el anticuerpo multiespecífico está caracterizado por que dicho anticuerpo multiespecífico es de la subclase humana IgG1 o de la subclase humana IgG1 con las mutaciones L234A y L235A. En otro modo de realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, el anticuerpo multiespecífico está caracterizado por que dicho anticuerpo multiespecífico es de la subclase humana IgG2. En otro modo de realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, el anticuerpo multiespecífico está caracterizado por que dicho anticuerpo multiespecífico es de la subclase humana IgG3. En otro modo de realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, el anticuerpo multiespecífico está caracterizado por que dicho anticuerpo multiespecífico es de la subclase humana IgG4 o de la subclase humana IgG4 con la mutación S228P adicional. En otro modo de realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, el anticuerpo multiespecífico está caracterizado por que dicho anticuerpo multiespecífico es de la subclase humana IgG1 o de la subclase humana IgG4. En otro modo de realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, el anticuerpo multiespecífico está caracterizado por que dicho anticuerpo multiespecífico es de la subclase humana IgG1 con las mutaciones L234A y L235A (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En otro modo de realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, el anticuerpo multiespecífico está caracterizado por que dicho anticuerpo multiespecífico es de la subclase humana IgG1 con las mutaciones L234A, L235A y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En otro modo de realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, el anticuerpo multiespecífico está caracterizado por que dicho anticuerpo multiespecífico es de la subclase humana IgG4 con las mutaciones S228P y L235E (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En otro modo de realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, el anticuerpo multiespecífico está caracterizado por que dicho anticuerpo multiespecífico es de la subclase humana IgG4 con las mutaciones S228P, L235E y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

45 En un modo de realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que incluye un dominio CH3 como se especifica en el presente documento, comprende un dipéptido de glicina-lisina C terminal adicional (G446 y K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un modo de realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que incluye un dominio CH3, como se especifica en el presente documento, comprende un residuo de glicina C terminal adicional (G446, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

## 50 **5. Variantes de anticuerpo**

En determinados modos de realización se contemplan variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se pueden preparar variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o por síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno.

### **a) Variantes de sustitución, inserción y deleción**

65 En determinados modos de realización, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones aminoácidas. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las HVR y las FR. En la tabla 1 se muestran sustituciones conservadoras bajo el encabezado "sustituciones conservadoras". Se

proporcionan cambios más sustanciales en la tabla 1 bajo el encabezado "sustituciones ejemplares" y como se describe además a continuación en referencia a las clases de cadenas laterales de aminoácidos. Se pueden introducir sustituciones aminoacídicas en un anticuerpo de interés y cribar los productos para determinar una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno retenida/mejorada, inmunogenicidad disminuida, o ADCC o CDC mejorada.

5

TABLA 1

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones conservadoras
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucina	Leu

10 Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con propiedades de cadena lateral comunes:

(1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

15

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

20 (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras conllevarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

25

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo original (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para otro estudio tendrá(n) modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad incrementada, inmunogenicidad reducida) en relación con el anticuerpo original y/o habrá(n) retenido sustancialmente determinadas propiedades biológicas del anticuerpo original. Una variante de sustitución ejemplar es un anticuerpo madurado en afinidad, que se puede generar convenientemente, por ejemplo, usando técnicas de maduración de la afinidad basadas en presentación en fagos, tales como las descritas en el presente documento. En resumen, se mutan uno o más residuos de HVR y los anticuerpos variantes se presentan en fagos y se criban para determinar una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión).

35

Se pueden realizar alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en las HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Dichas alteraciones se pueden realizar en "puntos calientes" de la HVR, es decir, residuos codificados por codones que se someten a una mutación con alta frecuencia durante el procedimiento de maduración somática (véase, por ejemplo, Chowdhury, P.S., *Methods Mol. Biol.* 207 (2008) 179-196), y/o residuos que entran en contacto con el antígeno, sometiendo a prueba el VH o VL variante resultante para determinar la afinidad de unión. Se ha descrito la maduración en afinidad por la construcción y reelección de colecciones secundarias, por ejemplo, en Hoogenboom, H.R. *et al.*, en *Methods in Molecular Biology* 178 (2002) 137. En algunos modos de realización de maduración en afinidad, se introduce diversidad en los genes variables elegidos para su maduración por cualquiera de una variedad de procedimientos (por ejemplo, PCR propensa a error, reordenamiento de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). A continuación, se crea una segunda colección. A continuación, se criba la colección para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro procedimiento para introducir diversidad implica enfoques dirigidos a HVR, en los que se aleatorizan varios residuos de HVR (por ejemplo, 4-6 residuos a la vez). Se pueden identificar específicamente los residuos de HVR implicados en la unión a antígeno, por ejemplo, usando mutagénesis o modelado por barrido de alanina. A menudo se seleccionan como diana, en particular, CDR-H3 y CDR-L3.

En determinados modos de realización se pueden producir sustituciones, inserciones o deleciones dentro de una o más HVR, siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo de unirse al antígeno. Por ejemplo, se pueden realizar alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras como se proporciona en el presente documento) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión en las HVR. Dichas alteraciones pueden estar, por ejemplo, fuera de los residuos en contacto con el antígeno en las HVR. En determinados modos de realización de las secuencias de VH y VL variantes proporcionadas anteriormente, cada HVR está inalterada o bien no contiene más de una, dos o tres sustituciones aminoacídicas.

Un procedimiento útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que se puede seleccionar como diana para la mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe por Cunningham, B.C. y Wells, J.A., *Science* 244 (1989) 1081-1085. En este procedimiento, un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados tales como Arg, Asp, His, Lys, y Glu) se identifican y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con antígeno se ve afectada. Se pueden introducir otras sustituciones en las localizaciones de aminoácidos que demuestren sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. De forma alternativa, o adicionalmente, una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos adyacentes se pueden seleccionar como diana o eliminar como candidatos para la sustitución. Se pueden cribar variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones en el extremo amínico y/o carboxílico que varían en longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuenciales de residuos de aminoácido únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que incrementa la semivida en suero del anticuerpo.

#### b) Variantes de glucosilación

En determinados modos de realización se altera un anticuerpo proporcionado en el presente documento para incrementar o disminuir el grado en el que el anticuerpo se glucosila. La adición o deleción de sitios de glucosilación en un anticuerpo se puede lograr convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se crean o se retiran uno o más sitios de glucosilación.

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato unido a la misma. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero comprenden típicamente un oligosacárido biantenarico ramificado que se une, en general, por un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc (véase, por ejemplo, Wright, A. y Morrison, S.L., *TIBTECH* 15 (1997) 2632). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a un GlcNAc en el "tallo" de la estructura oligosacárida biantenarica. En algunos modos de realización, se pueden realizar modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención para crear variantes de anticuerpo con determinadas propiedades mejoradas.

En un modo de realización, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una estructura carbohidratada que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser de un 1 % a un 80 %, de un 1 % a un 65 %, de un 5 % a un 65 % o de un 20 % a un 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa en la cadena glucídica en Asn297, con respecto a la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y de alto contenido en manosa) como se mide por espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2008/077546. Asn297 se refiere al residuo de asparagina localizado

en aproximadamente la posición 297 en la región Fc (numeración EU de los residuos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también se puede localizar aproximadamente  $\pm 3$  aminoácidos corriente arriba o corriente abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia menores en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una función ADCC mejorada. Véase, por ejemplo, el documento US 2003/0157108; el documento US 2004/0093621. Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpo "desfucosilado" o "carente de fucosa" incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki, A. *et al.*, J. Mol. Biol. 336 (2004) 1239-1249; Yamane-Ohnuki, N. *et al.*, Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622. Los ejemplos de líneas celulares que pueden producir anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lec13 carentes de fucosilación de proteínas (Ripka, J. *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 249 (1986) 533-545; documentos US 2003/0157108; y WO 2004/056312, especialmente el ejemplo 11), y líneas celulares genoinactivadas, tales como el gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO genoinactivadas (véanse, por ejemplo, Yamane-Ohnuki, N. *et al.*, Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622; Kanda, Y. *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 94 (2006) 680-688; y el documento WO 2003/085107).

Se proporcionan además variantes de anticuerpo con oligosacáridos bisecados, por ejemplo, en las que un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo se biseca por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una fucosilación reducida y/o función ADCC mejorada. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpo, por ejemplo, en los documentos WO 2003/011878; US 6.602.684; y US 2005/0123546. También se proporcionan variantes de anticuerpo con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una función CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en los documentos WO1997/30087; WO 1998/58964; y WO 1999/22764.

### c) Variantes de la región Fc

En determinados modos de realización se pueden introducir una o más modificaciones aminoacídicas en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en el presente documento, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprenda una modificación aminoacídica (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácido.

En determinados modos de realización, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas, pero no todas, las funciones efectoras, que le convierten en un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* sea importante, aunque determinadas funciones efectoras (tales como el complemento y ADCC) sean innecesarias o perjudiciales. Se pueden llevar a cabo ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/disminución de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo ensayos de unión al receptor de Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carezca de unión a Fc $\gamma$ R (de ahí que probablemente carezca de actividad ADCC), pero retenga su capacidad de unión a FcRn. Las principales células mediadoras de la CCDA, los linfocitos NK, expresan solamente FcRIII, mientras que los monocitos expresan Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch, J.V. y Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492. Los ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describen en el documento US 5.500.362 (véanse, por ejemplo, Hellstrom, I. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA83 (1986) 70597063; y Hellstrom, I. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 14991502); documento US 5.821.337 (véase Bruggemann, M. *et al.*, J. Exp. Med. 166 (1987) 13511361). De forma alternativa, se pueden emplear procedimientos de ensayo no radioactivos (véanse, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radioactivo ACTI™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); y el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, se puede evaluar *in vivo* la actividad ADCC de la molécula de interés, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes, R. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA95 (1998) 652656. También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo no se puede unir a C1q y por tanto carece de actividad CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (véanse, por ejemplo, Gazzano-Santoro, H., *et al.*, J. Immunol. Methods 202 (1996) 163171; Cragg, M.S., *et al.*, Blood 101 (2003) 10451052; y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, Blood 103 (2004) 27382743). También se pueden realizar las determinaciones de la unión a FcRn y eliminación/semivida *in vivo* usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. *et al.*, Int. Immunol. 18 (2006) 1759-1769).

Los anticuerpos con una función efectora reducida incluyen aquellos con una sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (documento US 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácido 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el llamado mutante de Fc "DANA" con la sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (documento US 7.332.581).

Se describen determinadas variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida al FcR (véanse, por ejemplo, los documentos US 6.737.056, WO 2004/056312, y Shields, R.L. *et al.*, J. Biol. Chem. 276 (2001) 65916604).

5 En determinados modos de realización, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones aminoacídicas que mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de residuos).

10 En algunos modos de realización, se realizan alteraciones en la región Fc, que dan como resultado una unión a C1q y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alterada (es decir, mejorada o bien disminuida), por ejemplo, como se describe en los documentos US 6.194.551, WO 99/51642, e Idusogie, E.E. *et al.*, J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184.

15 En el documento US 2005/0014934, se describen anticuerpos con semividas incrementadas y unión mejorada al receptor de Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer, R.L. *et al.*, J. Immunol. 117 (1976) 587-593, y Kim, J.K. *et al.*, J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen las de sustituciones en uno o más de los residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, sustitución del residuo 434 de la región Fc (documento US 7.371.826).

20 Véanse también Duncan, A.R. y Winter, G., Nature 322 (1988) 738740; los documentos US 5.648.260; US 5.624.821; y WO 94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

#### 25 **d) Variantes de anticuerpo genomanipulado con cisteína**

En determinados modos de realización, puede ser deseable crear anticuerpos genomanipulados con cisteína, por ejemplo, "thioMAb", en los que uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen con residuos de cisteína. En modos de realización particulares, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Al sustituir esos residuos con cisteína, los grupos tiol reactivos se posicionan de este modo en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden usar para conjugar el anticuerpo a otros restos, tales como restos de fármaco o restos de conector-fármaco, para crear un inmunoconjugado, como se describe además en el presente documento. En determinados modos de realización, se puede sustituir con cisteína uno cualquiera o más de los siguientes residuos: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc con las cadenas pesadas. Los anticuerpos genomanipulados con cisteína se pueden generar como se describe, por ejemplo, en el documento US 7.521.541.

#### 35 **e) Derivados de anticuerpo**

40 En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento se puede modificar además para que contenga restos no proteínicos adicionales que son conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles. Los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhidrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o bien copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)/polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de prolipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y mezclas de los mismos. El polietilenglicol-propionaldehído puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y, si se une más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización se puede determinar en base a consideraciones incluyendo, pero sin limitarse a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se van a mejorar, ya sea si el derivado de anticuerpo se usará en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

55 En otro modo de realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y un resto no proteínico que se pueden calentar selectivamente por exposición a la radiación. En un modo de realización, el resto no proteínico es un nanotubo de carbono (Kam, N.W. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda, e incluye, pero no se limita a, longitudes de onda que no dañan a las células normales, pero que calientan el resto no proteínico a una temperatura a la que se destruyen las células proximales al anticuerpo-resto no proteínico.

#### 60 **B. Módulos lanzadera a través de la barrera hematoencefálica**

65 En un modo de realización de todos los aspectos, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo multiespecífico que tiene al menos una especificidad de unión por el receptor de transferrina y al menos una especificidad de unión por una diana terapéutica, en el que el sitio de unión que se une específicamente al receptor de transferrina humano

comprende un dominio variable de la cadena de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37. En un modo de realización, el anticuerpo comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une al receptor de transferrina y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a un antígeno cerebral. En otro modo de realización, el antígeno cerebral se selecciona del grupo que consiste en Abeta, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), alfa-sinucleína, CD20, glucocerebrosidasa o proteína precursora amiloidea (APP). En un modo de realización preferente, el anticuerpo multiespecífico se une tanto

- i) al receptor de transferrina como a Abeta, o
- ii) al receptor de transferrina como a CD20, o
- iii) al receptor de transferrina como a alfa-sinucleína, o
- iv) al receptor de transferrina como a fosfo-tau, o
- v) al receptor de transferrina como a HER2, o
- vi) al receptor de transferrina como a glucocerebrosidasa.

En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 formando un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 81 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 82 un sitio de unión para Abeta.

En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 formando un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 79 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 80 un sitio de unión para CD20 humano. En un modo de realización, la región variable de la cadena pesada comprende un reemplazo del residuo de aminoácido en la posición 11 de Kabat con cualquier aminoácido excepto leucina. En un modo de realización, la sustitución comprende un reemplazo del residuo de aminoácido en la posición 11 de Kabat con un aminoácido no polar. En un modo de realización preferente, la sustitución comprende un reemplazo del residuo de aminoácido en la posición 11 de Kabat en el dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 79 con un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en valina, leucina, isoleucina, serina, y fenilalanina.

En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 formando un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 83 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 84 un sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 formando un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada humanizado derivado de SEQ ID NO: 85 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado derivado de SEQ ID NO: 86 un sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 formando un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada humanizado derivado de SEQ ID NO: 87 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado derivado de SEQ ID NO: 88 un sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 formando un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada humanizado derivado de SEQ ID NO: 89 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado derivado de SEQ ID NO: 90 un sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 formando un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada humanizado derivado de SEQ ID NO: 91 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado derivado de SEQ ID NO: 92 un sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 formando un sitio de unión para el receptor de transferrina y al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada humanizado derivado de SEQ ID NO: 93 y un dominio variable de la cadena ligera humanizado derivado de SEQ ID NO: 94 un sitio de unión para alfa-sinucleína humana.

En un modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende al menos un par de un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37 formando un sitio de unión para el receptor de transferrina y un sitio de unión para glucocerebrosidasa humana.

Las entidades de unión monovalentes que se unen específicamente a un receptor de la barrera hematoencefálica se pueden caracterizar con respecto a sus propiedades de unión y transcitosis:

- unión celular eficaz de células que expresan el RBHE como entidad de unión monovalente,
- transcitosis *in vitro* eficaz como entidad de unión monovalente,
- reactividad cruzada humano-macaco cangrejero (por ejemplo, en experimentos de BIAcore y FACS).

El cribado de transcitosis se puede realizar en un ensayo basado en hCMEC/D3. El ensayo se puede realizar en un modo de pulso y caza. Las células endoteliales cerebrales hCMEC/D3 se incuban con la entidad de unión monovalente durante 1 hora, después de esto, se lavan y se determinan los siguientes parámetros 0 horas y 4 horas después del lavado:

- i) cantidad de entidad de unión monovalente captada por las células durante la fase de carga,
- ii) cantidad basolateral de entidad de unión monovalente 4 horas después de la carga y lavado;
- iii) cantidad apical de entidad de unión monovalente 4 horas después de la carga y lavado;
- iv) cantidad de entidad de unión monovalente en las células (por lisis celular) 0 horas y 4 horas después de la carga y lavado;
- v) cantidad total de entidad de unión monovalente 0 horas y 4 horas después de la carga y lavado.

Para ser idóneo como entidad de unión monovalente en un módulo lanzadera a través de la barrera hematoencefálica como se informa en el presente documento, el anticuerpo anti-receptor de transferrina (por ejemplo, como entidad de unión monovalente) tiene que i) captarse por las células hCMEC/D3 (endocitosis), ii) transportarse fuera de las células hCMEC/D3 (exocitosis) y iii) ser estable dentro de las células hCMEC/D3 (transporte bajo o nulo al endosoma para su degradación).

Por tanto, en un modo de realización, la entidad de unión monovalente está caracterizada, en un ensayo basado en hCMEC/D3, por i) una captación (sustancial) en las células hCMEC/D3 durante un periodo de carga de una hora, ii) una liberación en el compartimento apical y/o basolateral después del periodo de carga y una etapa de lavado dentro de las 4 horas después del lavado, y iii) una baja tasa de degradación (intracelular).

En un modo de realización, la carga está a una concentración de aproximadamente 2,67 µg/ml de entidad de unión monovalente durante una hora.

Se ha descubierto que, para que una entidad de unión monovalente sea idónea como entidad de unión monovalente de un módulo lanzadera a través de la barrera hematoencefálica como se informa en el presente documento, tiene que mostrar, en el ensayo basado en hCMEC/D3 descrito anteriormente, los siguientes valores umbral:

- i) una cantidad de entidad de unión monovalente captada en las células durante la fase de carga de 400 pg o más,
- ii) cantidad basolateral de entidad de unión monovalente 4 horas después de la carga y lavado de 100 pg o más, y
- iii) cantidad apical de entidad de unión monovalente 4 horas después de la carga y lavado de 150 pg o más.

El anticuerpo anti-receptor de transferrina humano 128.1 de ratón (para secuencias de región variable, véase el documento WO 93/10819 y SEQ ID NO: 64 y 65) se puede tomar como referencia. En este caso, para que la entidad de unión monovalente sea idónea como entidad de unión monovalente de un módulo lanzadera a través

de la barrera hematoencefálica como se informa en el presente documento, tiene que mostrar, en el ensayo basado en hCMEC/D3 descrito anteriormente, los siguientes valores umbral:

- 5 i) una cantidad de entidad de unión monovalente captada en las células durante la fase de carga de un 60 % o más de la carga del anticuerpo 128.1,
- ii) cantidad basolateral de entidad de unión monovalente 4 horas después de la carga y lavado de un 60 % o más de la cantidad basolateral de anticuerpo 128.1; y
- 10 iii) cantidad apical de entidad de unión monovalente 4 horas después de la carga y lavado de un 60 % o más de la cantidad apical de anticuerpo 128.1.

El ensayo basado en hCMEC/D3 se puede realizar como sigue (este es un modo de realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento):

15 el medio y los complementos para hCMEC/D3 (véase el documento WO 2006/056879 y Weksler, B.B., *et al.*, FASEB J. 19 (2005) 1872-1874) se pueden obtener de Lonza. Las células hCMEC/D3 (pases 26-29) se cultivan/se pueden cultivar hasta la confluencia en cubreobjetos recubiertos con colágeno (microscopia) o matraces en medio EBM2 que contiene FBS al 2,5 %, una cuarta parte de los factores de crecimiento administrados y completamente  
20 complementados con hidrocortisona, gentamicina y ácido ascórbico administrados.

Para todos los ensayos de transcitosis, se usan/se pueden usar insertos de filtro de membrana de PET (tamaño de poro de 0,4  $\mu\text{m}$ , diámetro de 12 mm) con alta densidad de poros ( $1 \times 10^8$  poros/ $\text{cm}^2$ ) en placas de cultivo celular de 12 pocillos. Los volúmenes de los medios se calculan para ser de 400  $\mu\text{l}$  y 1600  $\mu\text{l}$  para las cámaras apicales y  
25 basolaterales, respectivamente. Las cámaras apicales de los insertos de filtro se recubren/se pueden recubrir con colágeno de cola de rata I (7,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) seguido de fibronectina (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), durando cada incubación una hora a TA. Las células hCMEC/D3 se cultivan/se pueden cultivar en monocapas confluentes ( $\sim 2 \times 10^5$  células/ $\text{cm}^2$ ) durante 10-12 días en medio EBM2. Los filtros vacíos se bloquean/se pueden bloquear en PBS que contiene BSA al 1 % durante 1 hora o durante la noche (d/n) antes del ensayo y, a continuación, se calibran durante al menos 1 hora  
30 en EBM2 antes del ensayo.

El ensayo (para el esquema de ensayo véase la figura 1) se realizó en medio EBM2 libre de suero que, de otro modo, se reconstituyó como se describe en el presente documento. El día del ensayo, las células se privan de suero durante 60 min para agotar el ligando natural del receptor de la barrera hematoencefálica en cuestión. Los  
35 insertos de filtro con o sin (pero bloqueados durante la noche en medio completo) células se incubaron apicalmente con los anticuerpos monoclonales en cuestión (entidad de unión monovalente) durante 1 hora a 37 °C. Las monocapas se lavaron a temperatura ambiente (TA) en medio libre de suero apicalmente (400  $\mu\text{l}$ ) y basolateralmente (1600  $\mu\text{l}$ ) tres veces durante 3-5 min cada una. Se añadió medio precalentado a la cámara apical y los filtros se transfirieron a una placa de 12 pocillos reciente (bloqueada durante la noche con PBS que contenía BSA al 1 %) que contenía 1600  $\mu\text{l}$  de medio precalentado. En este punto, los filtros con o sin células se lisaron en 500  $\mu\text{l}$  de tampón RIPA para determinar la captación de anticuerpos específicos (entidad de unión monovalente). Los filtros restantes se incubaron a 37 °C o a 4 °C y se obtuvieron muestras a diversos puntos de tiempo para determinar la liberación apical y/o basolateral del anticuerpo (entidad de unión monovalente). El contenido de anticuerpo en las muestras se puede cuantificar usando un ELISA de IgG altamente sensible (véase el ejemplo 9).  
45 Para cada punto de tiempo, los datos se deben generar a partir de dos filtros vacíos y tres cultivos celulares de filtro.

### C. Composiciones y procedimientos recombinantes

50 Los anticuerpos se pueden producir usando composiciones y procedimientos recombinantes, por ejemplo, como se describe en el documento US 4.816.567. En un modo de realización, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-receptor de transferrina descrito en el presente documento. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende el VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas ligera y/o pesada del anticuerpo). En otro modo de  
55 realización, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En otro modo de realización, se proporciona una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico. En un modo de realización de este tipo, una célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo. En un modo de realización, la célula huésped es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfocítica (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). En un modo de realización, se proporciona un procedimiento de preparación de un anticuerpo anti-receptor de transferrina, en el que el  
60 procedimiento comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se proporciona anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y, opcionalmente,



recuperar el anticuerpo de la célula huésped (o medio de cultivo de células huésped).

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-receptor de transferrina, el ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, como se describe anteriormente, se aísla e inserta en uno o más vectores para su clonación y/o expresión adicional en una célula huésped. Dicho ácido nucleico se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que se pueden unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo).

Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión de vectores que codifican el anticuerpo incluyen las células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos en bacterias, en particular, cuando no se necesitan la glucosilación ni la función efectora de Fc. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véanse, por ejemplo, los documentos US 5.648.237, US 5.789.199 y US 5.840.523. (Véase también Charlton, K.A., en: *Methods in Molecular Biology*, vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*). Después de su expresión, el anticuerpo se puede aislar de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente.

Además de procariotas, los microbios eucariotas tales como los hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos, incluyendo cepas de hongos y levaduras con vías de glucosilación que se han "humanizado", dando como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véanse Gemgross, T.U., *Nat. Biotech.* 22 (2004) 14091414; y Li, H. *et al.*, *Nat. Biotech.* 24 (2006) 210215.

Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo glucosilado también derivan de organismos pluricelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas baculovíricas que se pueden usar junto con células de insecto, en particular, para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También se pueden utilizar cultivos de células vegetales como huéspedes. Véanse, por ejemplo, los documentos US 5.959.177, US6.040.498, US6.420.548, US 7.125.978 y US 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

También se pueden usar células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas celulares de mamífero que se adaptan para cultivar en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 como se describe, por ejemplo, en Graham, F.L. *et al.*, *J. Gen Virol.* 36 (1977) 5974); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de Sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, J.P., *Biol. Reprod.* 23 (1980) 243252); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumor mamario de ratón (MMT060562); células TRI, como se describe, por ejemplo, en Mather, J.P. *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383 (1982) 44-68; células MRC5; y células FS4. Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR<sup>-</sup> (Urlaub, G. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 4216-4220); y líneas de células de mieloma, tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos véase, por ejemplo, Yazaki, P. y Wu, A.M., *Methods in Molecular Biology*, vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268.

## D. Ensayos

Los anticuerpos anti-receptor de transferrina proporcionados en el presente documento se pueden identificar, analizar o caracterizar por sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas por diversos ensayos conocidos en la técnica.

### 1. Ensayo de unión

En un aspecto, un anticuerpo de la invención se somete a prueba para determinar su actividad de unión a antígeno, por ejemplo, por procedimientos conocidos, tales como ELISA, alphaLISA, inmunoelectrotransferencia, matriz de anticuerpos o de fase inversa, etc.

En un ensayo ELISA o alphaLISA ejemplar, el receptor de transferrina en solución (sobrenadante celular, lisados celulares o tisulares, líquidos corporales, etc.) se une por un anticuerpo de captura, que se une específicamente a un primer epítipo en el receptor de transferrina, o receptor de transferrina en una determinada conformación y un anticuerpo de detección acoplado a una entidad de detección, que se une específicamente a un segundo epítipo o conformación del receptor de transferrina. La lectura se basa en la entidad de detección (quimioluminiscencia, fluorescencia, luminiscencia inducida por transferencia de energía, etc.).

En el caso de la matriz de anticuerpos, se colocan los anticuerpos sobre chips de vidrio o nitrocelulosa. Los portaobjetos se bloquean e incuban con una solución que contiene el receptor de transferrina, se lavan para retirar los anticuerpos no unidos y los anticuerpos unidos se detectan con un anticuerpo secundario correspondientemente marcado de forma fluorescente. Se mide la señal de fluorescencia con un escáner de portaobjetos para fluorescencia. De forma similar, para una matriz de fase inversa, el receptor de transferrina recombinante, sobrenadante celular, lisados celulares o tisulares, líquidos corporales, etc. se colocan sobre chips de vidrio o nitrocelulosa. Los portaobjetos se bloquean y las matrices individuales se incuban con un anticuerpo frente a un epítipo específico en el receptor de transferrina. Se retiran por lavado los anticuerpos no unidos y se detectan los anticuerpos unidos con un anticuerpo secundario correspondientemente marcado de forma fluorescente. Se mide la señal de fluorescencia por un escáner de portaobjetos para fluorescencia (Dernick, G., *et al.*, J. Lipid Res. 52 (2011) 2323-2331).

### E. Composiciones y procedimientos para diagnóstico y detección

En determinados modos de realización, cualquiera de los anticuerpos anti-receptor de transferrina proporcionados en el presente documento es útil para detectar la presencia del receptor de transferrina humano en una muestra biológica. El término "detectar" como se usa en el presente documento engloba la detección cuantitativa o cualitativa. En determinados modos de realización, una muestra biológica comprende una célula o tejido, tal como tejido cerebral.

En un modo de realización, se proporciona un anticuerpo anti-receptor de transferrina para su uso en un procedimiento de diagnóstico o detección. En otro aspecto, se proporciona un procedimiento de detección de la presencia del receptor de transferrina en una muestra biológica. En determinados modos de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-receptor de transferrina como se describe en el presente documento en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-receptor de transferrina al receptor de transferrina, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-receptor de transferrina y el receptor de transferrina. Dicho procedimiento puede ser un procedimiento *in vitro* o *in vivo*. En un modo de realización, se usa un anticuerpo anti-receptor de transferrina para seleccionar sujetos idóneos para su tratamiento con un anticuerpo anti-receptor de transferrina, por ejemplo, donde el receptor de transferrina es un biomarcador para la selección de pacientes.

Los trastornos ejemplares que se pueden diagnosticar usando un anticuerpo de la invención incluyen neurodegeneración con acumulación de hierro cerebral de tipo 1 (NBIA1), fallo autonómico puro, síndrome de Down, complejo de Guam y varios trastornos por cuerpos de Lewy, tales como enfermedad difusa por cuerpos de Lewy (EDCL), la variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer (vCLEA), determinadas formas de enfermedad de Gaucher y demencia de la enfermedad de Parkinson (DEP).

En determinados modos de realización, se proporcionan anticuerpos anti-receptor de transferrina marcados. Los marcadores incluyen, pero no se limitan a, marcadores o restos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromóforos, electrodenso, quimioluminiscentes y radioactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los radioisótopos  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  e  $^{131}\text{I}$ , fluoróforos, tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (documento US 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacáridos, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas, tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de tinte, tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

### F. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-receptor de transferrina como se describe en el presente documento se preparan mezclando dicho anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16.<sup>a</sup> edición, Osol, A. (ed.) (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son, en general, atóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen, pero no se limitan a: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa,

manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; glúcidos tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Los vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares en el presente documento incluyen además, agentes de dispersión intersticial del fármaco tales como glucoproteínas de hialuronidasa activa a pH neutro soluble (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa PH-20 soluble humana, tales como rhuPH20 (HYLENEX<sup>®</sup>, Baxter International, Inc.). Determinadas sHASEGP ejemplares y procedimientos de uso, incluyendo rhuPH20, se describen en los documentos US 2005/0260186 y US 2006/0104968. En un aspecto, una sHASEGP se combina con una o más glucosaminoglucanasas adicionales tales como condroitinasas.

Las formulaciones de anticuerpo liofilizadas ejemplares se describen en el documento US 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpo acuosas incluyen las descritas en los documentos US 6.171.586 y WO 2006/044908, incluyendo las últimas formulaciones un tampón histidina-acetato.

La formulación en el presente documento también puede contener más de un ingrediente activo según sea necesario para la indicación particular que se trata, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se vean afectados de forma adversa entre sí. Dichos ingredientes activos están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito destinado.

Los ingredientes activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa, o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16.<sup>a</sup> edición, Osol, A. (ed.) (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación mantenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación mantenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas.

Las formulaciones que se van a usar para su administración *in vivo* son, en general, estériles. La esterilidad se puede lograr fácilmente, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles.

### G. Composiciones y procedimientos terapéuticos

Se puede usar cualquiera de los anticuerpos anti-TfR proporcionados en el presente documento en procedimientos terapéuticos. En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-TfR para su uso como medicamento. Por ejemplo, la invención proporciona un procedimiento de transporte de un compuesto terapéutico a través de la barrera hematoencefálica que comprende exponer el anticuerpo anti-TfR acoplado a un compuesto terapéutico (por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico que se une tanto al TfR como a un antígeno cerebral) a la BHE de modo que el anticuerpo transporta el compuesto terapéutico acoplado al mismo a través de la BHE. En otro ejemplo, la invención proporciona un procedimiento de transporte de un fármaco para trastornos neurológicos a través de la barrera hematoencefálica que comprende exponer un anticuerpo anti-TfR de la invención acoplado a un fármaco para trastornos cerebrales (por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico que se une tanto al TfR como a un antígeno cerebral) a la BHE de modo que el anticuerpo transporta el fármaco para trastornos neurológicos acoplado al mismo a través de la BHE. En un modo de realización, la BHE es de un mamífero (por ejemplo, un ser humano), por ejemplo, uno que tenga un trastorno neurológico, incluyendo, sin limitación: enfermedad de Alzheimer (EA), apoplejía, demencia, distrofia muscular (DM), esclerosis múltiple (EM), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), fibrosis quística, síndrome de Angelman, síndrome de Liddle, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, enfermedad de Paget, cáncer, traumatismo craneoencefálico, etc. En un modo de realización, el trastorno neurológico se selecciona de: una neuropatía, una amiloidosis, un cáncer (por ejemplo, que afecta al SNC o cerebro), una enfermedad o trastorno ocular, una infección vírica o microbiana, inflamación (por ejemplo, del SNC o cerebro), isquemia, enfermedad neurodegenerativa, convulsiones, trastorno del comportamiento, enfermedad de almacenamiento lisosómico, etc. Los anticuerpos de la invención son, en particular, adecuados para el tratamiento de dichos trastornos neurológicos debido a su capacidad de transportar uno o más ingredientes activos asociados/compuestos terapéuticos acoplados a través de la BHE y al SNC/cerebro, donde dichos trastornos encuentran su base molecular, celular o vírica/microbiana. Los trastornos neuropáticos son enfermedades o anomalías del sistema nervioso que están caracterizados por una señalización nerviosa inapropiadas o incontrolada o carencia de la misma, e incluyen, pero no se limitan a, dolor crónico (incluyendo dolor nocisensible), dolor provocado por una lesión en los tejidos corporales, incluyendo dolor relacionado con cáncer, dolor neuropático (dolor provocado por anomalías en los nervios, médula espinal o cerebro) y dolor psicógeno (total o principalmente relacionado con un trastorno psicológico), cefalea, migraña, neuropatía, y síntomas y síndromes que a menudo acompañan a dichos trastornos neuropáticos, tales como vértigo o náuseas.

Para un trastorno neuropático, se puede seleccionar un fármaco neurológico que sea un analgésico, incluyendo, pero sin limitarse a, un analgésico opiáceo/opioide (es decir, morfina, fentanilo, hidrocodona, petidina, metadona,

oximorfona, pentazocina, propoxifeno, tramadol, codeína y oxycodona), un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) (es decir, ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco, diflunisal, etodolaco, fenoprofeno, flurbiprofeno, indometacina, ketorolaco, ácido mefenámico, meloxicam, nabumetona, oxaprozina, piroxicam, sulindaco y tolmetina), un corticoesteroide (es decir, cortisona, prednisona, prednisolona, dexametasona, metilprednisolona y triamcinolona), un agente antimigrañoso (es decir, sumatriptina, almotriptán, frovatriptán, sumatriptán, rizatriptán, eletriptán, zolmitriptán, dihidroergotamina, eletriptán y ergotamina), paracetamol, un salicilato (es decir, ácido acetilsalicílico, salicilato de colina, salicilato de magnesio, diflunisal y salsalato), un anticonvulsivo (es decir, carbamacepina, clonazepam, gabapentina, lamotrigina, pregabalina, tiagabina y topiramato), un anestésico (es decir, isoflurano, tricloroetileno, halotano, sevoflurano, benzocaína, cloroprocaína, cocaína, ciclometacaína, dimetocaína, propoxicaína, procaína, novocaína, proparacaína, tetracaína, articaína, bupivacaína, carticaína, cincocaína, etidocaína, levobupivacaína, lidocaína, mepivacaína, piperocaína, prilocaína, ropivacaína, trimecaína, saxitoxina y tetrodotoxina), y un inhibidor de cox-2 (es decir, celecoxib, rofecoxib y valdecoxib). Para un trastorno neuropático con afectación por vértigo, se puede seleccionar un fármaco neurológico que sea un agente antivertiginoso, incluyendo, pero sin limitarse a, meclizina, difenhidramina, prometazina y diazepam. Para un trastorno neuropático con afectación por náuseas, se puede seleccionar un fármaco neurológico que sea un agente antiemético, incluyendo, pero sin limitarse a, prometazina, clorpromazina, proclorperazina, trimetobenzamida y metoclopramida.

Las amiloidosis son un grupo de enfermedades y trastornos asociados con los depósitos proteínicos extracelulares en el SNC, incluyendo, pero sin limitarse a, amiloidosis secundaria, amiloidosis senil, enfermedad de Alzheimer (EA), deterioro cognitivo leve (DCL), demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (de tipo holandés); el complejo de Parkinson-demencia de Guam, angiopatía amiloide cerebral, enfermedad de Huntington, parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Parkinson, encefalopatía esponjiforme transmisible, demencia relacionada con VIH, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), miositis con cuerpos de inclusión (MCI) y enfermedades oculares relacionadas con el depósito de amiloide beta (es decir, degeneración macular, neuropatía óptica relacionada con drusas y cataratas).

Para la amiloidosis, se puede seleccionar un fármaco neurológico que incluya, pero no se limite a, un anticuerpo u otra molécula de unión (incluyendo, pero sin limitarse a, una molécula pequeña, un péptido, un aptámero u otra proteína de unión) que se una específicamente a una diana seleccionada de: beta-secretasa, tau, presenilina, proteína precursora amiloidea o porciones de la misma, péptido amiloide beta u oligómeros o fibrillas del mismo, receptor de muerte 6 (DR6), receptor para productos finales de glucación avanzada (RAGE), parkina y huntingtina; un inhibidor de la colinesterasa (es decir, galantamina, donepezilo, rivastigmina y tacrina); un antagonista del receptor de NMDA (es decir, memantina), un agotador de monoaminas (es decir, tetrabenazina); un mesilato ergoloide; un agente antiparkinsonismo anticolinérgico (es decir, prociclidina, difenhidramina, trihexifenidilo, benzatropina, biperideno y trihexifenidilo); un agente antiparkinsonismo dopaminérgico (es decir, entacapona, selegilina, pramipexol, bromocriptina, rotigotina, selegilina, ropinirol, rasagilina, apomorfina, carbidopa, levodopa, pergolida, tolcapona y amantadina); una tetrabenazina; un antiinflamatorio (incluyendo, pero sin limitarse a, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (es decir, indometicina y otros compuestos enumerados anteriormente); una hormona (es decir, estrógeno, progesterona y leuprorrelina); una vitamina (es decir, folato y nicotinamida); una dimebolina; una homotaurina (es decir, ácido 3-aminopropanosulfónico; 3-APS); un modulador de la actividad del receptor de serotonina (es decir, xaliprodeno); un interferón y un glucocorticoide.

Los cánceres del SNC están caracterizados por la proliferación anómala de una o más células del SNC (es decir, una célula neural) e incluyen, pero no se limitan a, glioma, glioblastoma multiforme, meningioma, astrocitoma, neuroma acústico, condroma, oligodendroglioma, meduloblastomas, ganglioglioma, schwannoma, neurofibroma, neuroblastoma y tumores extradurales, intramedulares, intradurales o metástasis al SNC de tumores periféricos, tales como cánceres positivos para CD20 o HER2.

Para el cáncer, se puede seleccionar un fármaco neurológico que sea un agente quimioterápico.

Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclosfosfamida CYTOXAN®; sulfonatos de alquilo, tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas, tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilfosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahydrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colquicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán) (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (en particular, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiostatina; mostazas nitrogenadas, tales como clorambucilo, clonafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, clormetina, clorhidrato de óxido de clormetina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, uramustina; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos enodiinos (por ejemplo, calicheamicina, especialmente

calicheamicina gamma II y calicheamicina omega II (véase, por ejemplo, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.*, 33 (1994) 183-186); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos enodiiinos de cromoproteínas relacionados), aclacinomisin, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinoflina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolinodoxorrubicina, cianomorfolinodoxorrubicina, 2-pirrolinodoxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-25-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, encocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; antiadrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedor de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfomitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinano; lonidamina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguzona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; phenamet, pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidracida; procarbacin; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente, toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbacina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; 5-pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers-Squibb Oncology, Princeton, N.J.), formulación de paclitaxel en nanopartículas genomanipuladas con albúmina libres de Cremophor ABRAXANETM (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y doxetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico; capecitabina (XELODA®); sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores, tales como CHOP, una abreviatura para un tratamiento combinado de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para una pauta de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATINTM) combinado con 5-FU y leucovovina.

También se incluyen en esta definición de agentes quimioterápicos agentes antihormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer, y que, a menudo, están en forma de tratamiento sistémico o en todo el cuerpo. Pueden ser hormonas por sí mismas. Los ejemplos incluyen antiestrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno EVISTA®, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON®; antiprogesteronas; reguladores por disminución del receptor de estrógenos (ERD); agentes que funcionan para suprimir o apagar los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) tales como acetato de leuprorrelina LUPRON® y ELIGARD®, acetato de goserelina, acetato de buserelina y triptorelina; otros antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de la aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIL®, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDEX®. Además, dicha definición de agentes quimioterápicos incluye bisfosfonatos, tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato DIDROCAL®, NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato ZOMETA®, alendronato FOSAMAX®, pamidronato AREDIA®, tiludronato SKELID® o risedronato ACTONEL®; así como troxacetabina (un análogo de 1,3-dioxolano nucleósido citosina); oligonucleótidos antisentido, en particular, los que inhiben la expresión de genes en las vías de señalización implicadas en la proliferación celular anómala, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas, tales como vacuna THERATOPE® y vacunas para el tratamiento génico, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; ditosilato de lapatinib (un inhibidor de molécula pequeña de tirosina cinasa doble para ErbB-2 y EGFR, también conocido como GW572016); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Otro grupo de compuestos que se pueden seleccionar como fármacos neurológicos para el tratamiento o prevención del cáncer son inmunoglobulinas antineoplásicas (incluyendo, pero sin limitarse a, trastuzumab, pertuzumab, bevacizumab, alemtuzumab, cetuximab, gemtuzumab ozogamicin, ibritumomab tiuxetan, panitumumab y rituximab). En algunos casos, se pueden usar anticuerpos junto con un marcador o conjugado tóxico para seleccionar como diana y destruir células deseadas (es decir, células cancerosas), incluyendo, pero sin limitarse a, tositumomab con un radiomarcador de 131I o trastuzumab emtansina.

Las enfermedades o trastornos oculares son enfermedades o trastornos del ojo, que, para los propósitos en el

presente documento, se considera un órgano del SNC segregado por la BHE. Las enfermedades o trastornos oculares incluyen, pero no se limitan a, trastornos de la esclerótica, córnea, iris y cuerpo ciliar (es decir, esclerosis, queratitis, úlcera corneal, abrasión corneal, nifablepsia, ojo de arco, queratitis puntiforme superficial de Thygeson, neovascularización corneal, distrofia de Fuchs, queratocono, queratoconjuntivitis seca, iritis y uveítis), trastornos del cristalino (es decir, cataratas), trastornos de la coroides y retina (es decir, desprendimiento de retina, retinosquiasis, retinopatía hipertensiva, retinopatía diabética, retinopatía, retinopatía del prematuro, degeneración macular senil, degeneración macular (húmeda o seca), membrana epirretiniana, retinitis pigmentosa y edema macular), glaucoma, moscas volantes, trastornos del nervio óptico y vías visuales (es decir, neuropatía óptica hereditaria de Leber y drusas del disco óptico), trastornos de los músculos oculares/movimiento binocular/acomodación/refracción (es decir, estrabismo, oftalmoparesia, oftalmoplejia externa progresiva, estrabismo convergente, estrabismo divergente, hipermetropía, miopía, astigmatismo, anisometropía, presbicia y oftalmoplejia), trastornos visuales y ceguera (es decir, ambliopía, amaurosis congénita de Lever, escotoma, daltonismo, acromatopsia, ambliopía nocturna, ceguera, oncocercosis y microftalmia/coloboma), conjuntivitis, signo de Argyll Robertson, queratocosis, xeroftalmia y aniridia.

Para una enfermedad o trastorno ocular, se puede seleccionar un fármaco neurológico que sea un agente oftálmico antiangiogénico (es decir, bevacizumab, ranibizumab y pegaptanib), un agente para glaucoma oftálmico (es decir, carbacol, epinefrina, bromuro de demecario, apraclonidina, brimonidina, brinzolamida, levobunolol, timolol, betaxolol, dorzolamida, bimatoprost, carteolol, metipranolol, dipivefrina, travoprost y latanoprost), un inhibidor de la anhidrasa carbónica (es decir metazolamida y acetazolamida), un antihistamínico oftálmico (es decir, nafazolina, fenilefrina y tetrahidrozolina), un lubricante ocular, un esteroide oftálmico (es decir, fluorometolona, prednisolona, loteprednol, dexametasona, difluprednato, rimexolona, fluocinolona, medrisona y triamcinolona), un anestésico oftálmico (es decir lidocaína, proparacaína y tetracaína), un antiinfeccioso oftálmico (es decir, levofloxacino, gatifloxacino, ciprofloxacino, moxifloxacino, cloranfenicol, bacitracina/polimixina B, sulfacetamida, tobramicina, azitromicina, besifloxacino, norfloxacino, sulfisoxazol, gentamicina, idoxuridina, eritromicina, natamicina, gramicidina, neomicina, ofloxacino, trifuridina, ganciclovir, vidarabina), un agente antiinflamatorio oftálmico (es decir, nepafenaco, ketorolaco, flurbiprofeno, suprofen, ciclosporina, triamcinolona, diclofenaco y bromfenaco), y un antihistamínico o descongestivo oftálmico (es decir, ketotifeno, olopatadina, epinastina, nafazolina, cromolina, tetrahidrozolina, pemirolast, bepotastina, nafazolina, fenilefrina, nedocromilo, lodoxamida, fenilefrina, emedastina y azelastina).

Las infecciones víricas o microbianas del SNC incluyen, pero no se limitan a, infecciones por virus (es decir, gripe, VIH, virus de la poliomielitis, rubéola), bacterias (es decir, *Neisseria sp.*, *Streptococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Proteus sp.*, *E. coli*, *S. aureus*, *Pneumococcus sp.*, *Meningococcus sp.*, *Haemophilus sp.* y *Mycobacterium tuberculosis*) y otros microorganismos, tales como hongos (es decir, levaduras, *Cryptococcus neoformans*), parásitos (es decir, *Toxoplasma gondii*) o amebas que dan como resultado fisiopatologías del SNC incluyendo, pero sin limitarse a, meningitis, encefalitis, mielitis, vasculitis y absceso, que pueden ser agudas o crónicas.

Para una enfermedad vírica o microbiana, se puede seleccionar un fármaco neurológico que incluya, pero no se limite a, un compuesto antivírico (incluyendo, pero sin limitarse a, un antivírico de adamantano (es decir, rimantadina y amantadina), un interferón antivírico (es decir, peg-interferón alfa-2b), un antagonista del receptor de quimiocina (es decir, maraviroc), un inhibidor de la transferencia de la cadena de integrasa (es decir, raltegravir), un inhibidor de la neuraminidasa (es decir, oseltamivir y zanamivir), un inhibidor no nucleosídico de la retrotranscriptasa (es decir, efavirenz, etravirina, delavirdina y nevirapina), inhibidores nucleosídicos de la retrotranscriptasa (tenofovir, abacavir, lamivudina, zidovudina, estavudina, entecavir, emtricitabina, adefovir, zalcitabina, telbivudina y didanosina), un inhibidor de la proteasa (es decir, darunavir, atazanavir, fosamprenavir, tipranavir, ritonavir, nelfinavir, amprenavir, indinavir y saquinavir), un nucleósido purínico (es decir, valaciclovir, famciclovir, aciclovir, ribavirina, ganciclovir, valganciclovir y cidofovir) y un antivírico variado (es decir, enfuvirtida, foscamet, palivizumab y fomivirsen)), un antibiótico (incluyendo, pero sin limitarse a, aminopenicilina (es decir, amoxicilina, ampicilina, oxacilina, nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucoxacilina, temocilina, azlocilina, carbenicilina, ticarcilina, mezlocilina y piperacilina y bacampicilina), una cefalosporina, (es decir, cefazolina, cefalexina, cefalotina, cefamandol, ceftriaxona, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima, cefadroxilo, cefradina, loracarbef, cefotetán, cefuroxima, cefprozilo, cefaclor y cefoxitina), un carbapenémico/penémico (es decir, imipenem, meropenem, ertapenem, faropenem y doripenem), un monobactámico (es decir, aztreonam, tigemonam, nocardicina A y tabtoxinina betalactámica), un inhibidor de la betalactamasa (es decir, ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam) junto con otro antibiótico betalactámico, un aminoglucósido (es decir, amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, estreptomina, tobramicina y paromomicina), una ansamicina (es decir, geldanamicina y herbimicina), un carbacefem (es decir, loracarbef), un glucopéptido (es decir, teicoplanina y vancomicina), un macrólido (es decir, azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina, troleandomicina, telitromicina y espectinomicina), un monobactámico (es decir, aztreonam), una quinolona (es decir, ciprofloxacino, enoxacino, gatifloxacino, levofloxacino, lomefloxacino, moxifloxacino, norfloxacino, ofloxacino, trovafloxacino, grepafloxacino, esparfloxacino y temafloxacino), una sulfonamida (es decir, mafenamida, sulfonamidocrisoidina, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfametizol, sulfanilamida, sulfasalazina, sulfisoxazol, trimetoprima, trimetoprima y sulfametoxazol), una tetraciclina (es decir, tetraciclina, demeclociclina, doxiciclina, minociclina y oxitetraciclina), un antibiótico antineoplásico o citotóxico (es decir, doxorubicina, mitoxantrona, bleomicina, daunorrubicina, dactinomina, epirubicina, idarrubicina, plicamicina, mitomicina,

pentostatina y valrubicina) y un compuesto antibacteriano variado (es decir, bacitracina, colistina y polimixina B)), un antifúngico (es decir, metronidazol, nitazoxanida, tinidazol, cloroquina, yodoquinol y paromomicina) y un antiparasitario (incluyendo, pero sin limitarse a, quinina, cloroquina, amodiaquina, pirimetamina, sulfadoxina, proguanil, mefloquina, atovacuona, primaquina, artemesinina, halofantrina, doxiciclina, clindamicina, mebendazol, pamoato de pirantel, tiabendazol, dietilcarbamazina, ivermectina, rifampina, anfotericina B, melarsoprol, efortinita y albendazol).

La inflamación del SNC incluye, pero no se limita a, inflamación que está provocada por una lesión en el SNC, que puede ser una lesión física (es decir, debido a un accidente, cirugía, traumatismo cerebral, lesión de la médula espinal, conmoción cerebral) y una lesión debida o relacionada con una o más de otras enfermedades o trastornos del SNC (es decir, absceso, cáncer, infección vírica o microbiana).

Para la inflamación del SNC, se puede seleccionar un fármaco neurológico que aborde la propia inflamación (es decir, un agente antiinflamatorio no esteroideo, tal como ibuprofeno o naproxeno), o uno que trate la causa subyacente de la inflamación (es decir, un agente antivírico o antineoplásico).

La isquemia del SNC, como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de trastornos relacionados con una circulación sanguínea o comportamiento vascular anómalo en el cerebro o a las causas de los mismos, e incluye, pero no se limita a: isquemia cerebral focal, isquemia cerebral global, apoplejía (es decir, hemorragia subaracnoidea y hemorragia intracerebral) y aneurisma.

Para la isquemia, se puede seleccionar un fármaco neurológico que incluya, pero no se limite a, un trombolítico (es decir, urocinasa, alteplasa, reteplasa y tenecteplasa), un inhibidor de la agregación plaquetaria (es decir, ácido acetilsalicílico, cilostazol, clopidogrel, prasugrel y dipiridamol), una estatina (es decir, lovastatina, pravastatina, fluvastatina, rosuvastatina, atorvastatina, simvastatina, cerivastatina y pitavastatina) y un compuesto para mejorar la circulación sanguínea o la flexibilidad vascular, incluyendo, por ejemplo, antihipertensivos.

Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la pérdida de función o muerte de las células neurales en el SNC, e incluyen, pero no se limitan a: adrenoleucodistrofia, enfermedad de Alexander, enfermedad de Alper, esclerosis lateral amiotrófica, ataxia telangiectasia, enfermedad de Batten, síndrome de Cockayne, degeneración corticobasal, degeneración provocada por o asociada con una amiloidosis, ataxia de Friedreich, degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de Kennedy, atrofia multisistémica, esclerosis múltiple, esclerosis lateral primaria, parálisis supranuclear progresiva, atrofia muscular espinal, mielitis transversa, enfermedad de Refsum y ataxia espinocerebelosa.

Para una enfermedad neurodegenerativa, se puede seleccionar un fármaco neurológico que sea una hormona del crecimiento o factor neurótrofo; los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, el factor neurótrofo derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento nervioso (NGF), neurotrofina-4/5, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)-2 y otros FGF, neurotrofina (NT)-3, eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento y transformación (TGF)-alfa, TGF-beta, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1ra), factor neurótrofo ciliar (CNTF), factor neurótrofo derivado de la neuroglia (GDNF), neurturina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), heregulina, neuregulina, artemina, persefina, interleucinas, factor neurótrofo derivado de la línea de neuroglíocitos (GFR), factor estimulante de colonias de granulocitos (CSF), CSF de granulocitos-macrófagos, netrinas, cardiotrofina-1, hedgehogs, factor inhibidor de la leucemia (LIF), midkina, pleiotrofina, proteínas morfogenéticas óseas (BMP), netrinas, saposinas, semaforinas y factor de células madre (SCF).

Las enfermedades y trastornos convulsivos del SNC implican una conducción eléctrica inapropiada y/o anómala en el SNC, e incluyen, pero no se limitan a, epilepsia (es decir, crisis de ausencia, crisis atónicas, epilepsia rolándica benigna, ausencia infantil, convulsiones clónicas, convulsiones parciales complejas, epilepsia del lóbulo frontal, convulsiones febriles, espasmos infantiles, epilepsia mioclónica juvenil, epilepsia de ausencia juvenil, síndrome de Lennox-Gastaut, síndrome de Landau-Kleffner, síndrome de Dravet, síndrome Otahara, síndrome de West, convulsiones mioclónicas, trastornos mitocondriales, epilepsias mioclónicas progresivas, convulsiones psicógenas, epilepsia refleja, síndrome de Rasmussen, convulsiones parciales simples, convulsiones generalizadas secundarias, epilepsia del lóbulo temporal, convulsiones toniclónicas, convulsiones tónicas, convulsiones psicomotoras, epilepsia límbica, convulsiones de inicio parcial, convulsiones de inicio generalizado, estado epiléptico, epilepsia abdominal, convulsiones acinéticas, convulsiones autónomas, mioclonía bilateral masiva, epilepsia catamenial, crisis atónicas, convulsiones emocionales, convulsiones focales, convulsiones gelásticas, progresión jacksoniana, enfermedad de Lafora, convulsiones motoras, convulsiones multifocales, convulsiones nocturnas, convulsiones fotosensibles, pseudoconvulsiones, convulsiones sensoriales, convulsiones leves, convulsiones de Sylvan, convulsiones por abstinencia y convulsiones reflejas visuales). Para un trastorno convulsivo, se puede seleccionar un fármaco neurológico que sea un anticonvulsivo o antiépiléptico, incluyendo, pero sin limitarse a, anticonvulsivos barbitúricos (es decir, primidona, metarbital, mefobarbital, alobarbital, amobarbital, aprobarbital, alfenal, barbital, bralobarbital y fenobarbital), anticonvulsivos benzodiacepínicos (es decir, diazepam, clonazepam y lorazepam), anticonvulsivos de carbamato (es decir, felbamato), anticonvulsivos inhibidores de la anhidrasa carbónica (es decir, acetazolamida, topiramato y zonisamida), anticonvulsivos

dibenzacepínicos (es decir rufinamida, carbamacepina y oxcarbacepina), anticonvulsivos derivados de ácidos grasos (es decir, divalproex y ácido valproico), análogos de ácido gamma-aminobutírico (es decir, pregabalina, gabapentina y vigabatrina), inhibidores de la recaptación de ácido gamma-aminobutírico (es decir, tiagabina), inhibidores de la ácido gamma-aminobutírico transaminasa (es decir, vigatrabina), anticonvulsivos de hidantoína (es decir, fenitoína, etotoína, fosfenitoína y mefenitoína), anticonvulsivos variados (es decir, lacosamida y sulfato de magnesio), progestinas (es decir, progesterona), anticonvulsivos de oxazolidindiona (es decir, parametadiona y trimetadiona), anticonvulsivos de pirrolidina (es decir, levetiracetam), anticonvulsivos de succinimida (por ejemplo, etosuximida y metosuximida), anticonvulsivos de triazina (es decir, lamotrigina) y anticonvulsivos de urea (es decir, fenacemida y feneturida).

Los trastornos del comportamiento son trastornos del SNC caracterizados por un comportamiento anómalo por parte del sujeto aquejado e incluyen, pero no se limitan a: trastornos del sueño (es decir, insomnio, parasomnias, terrores nocturnos, trastornos del sueño por alteraciones del ritmo circadiano y narcolepsia), trastornos del estado de ánimo (es decir, depresión, depresión con intento de suicidio, ansiedad, trastornos afectivos crónicos, fobias, crisis de angustia, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), trastorno por déficit de atención (TDA), síndrome de fatiga crónica, agorafobia, trastorno por estrés postraumático, trastorno bipolar), trastornos de la conducta alimentaria (es decir, anorexia o bulimia), psicosis, trastornos del comportamiento y del desarrollo (es decir, autismo, síndrome de Rett, síndrome de Asperger), trastornos de la personalidad y trastornos psicóticos (es decir, esquizofrenia, trastorno delirante y similares).

Para un trastorno del comportamiento, se puede seleccionar un fármaco neurológico de un compuesto modificador del comportamiento incluyendo, pero sin limitarse a, un antipsicótico atípico (es decir, risperidona, olanzapina, aripiprazol, quetiapina, paliperidona, asenapina, clozapina, iloperidona y ziprasidona), un antipsicótico de fenotiazina (es decir, proclorperazina, clorpromazina, flufenazina, perfenazina, trifluoperazina, tioridazina y mesoridazina), un tioxanteno (es decir, tiotixeno), un antipsicótico variado (es decir, pimozida, litio, molindona, haloperidol y loxapina), un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (es decir, citalopram, escitalopram, paroxetina, fluoxetina y sertralina), un inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina (es decir, duloxetina, venlafaxina, desvenlafaxina, un antidepresivo tricíclico (es decir, doxepina, clomipramina, amoxapina, nortriptilina, amitriptilina, trimipramina, imipramina, protriptilina y desipramina), un antidepresivo tetracíclico (es decir, mirtazapina y maprotilina), un antidepresivo de fenilpiperazina (es decir, trazodona y nefazodona), un inhibidor de la monoamino oxidasa (es decir, isocarboxazida, fenelzina, selegilina y tranilcipromina), una benzodiacepina (es decir, alprazolam, estazolam, flurazepam, clonazepam, lorazepam y diazepam), un inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina (es decir, bupropión), un estimulante del SNC (es decir, fentermina, dietilpropión, metanfetamina, dextroanfetamina, anfetamina, metilfenidato, dexmetilfenidato, lisdexanfetamina, modafnilo, pemolina, fendimetrazina, benzofetamina, fendimetrazina, armodafnilo, dietilpropión, cafeína, atomoxetina, doxapram y mazindol), un ansiolítico/sedante/hipnótico (incluyendo, pero sin limitarse a, un barbitúrico (es decir, secobarbital, fenobarbital y mefobarbital), una benzodiacepina (como se describe anteriormente) y un ansiolítico/sedante/hipnótico variado (es decir, difenhidramina, oxibato de sodio, zaleplón, hidroxizina, hidrato de cloral, aolpidem, buspirona, doxepina, eszopiclona, ramelteón, meprobamato y etclorvinol)), una secretina (véase, por ejemplo, Ratliff-Schaub *et al.* Autism 9 (2005) 256-265), un péptido opioide (véase, por ejemplo, Cowen *et al.*, J. Neurochem. 89 (2004) 273-285) y un neuropéptido (véase, por ejemplo, Hethwa *et al.* Am. J. Physiol. 289 (2005) E301-305).

Las enfermedades de almacenamiento lisosómico son trastornos metabólicos que, en algunos casos, están asociados con el SNC o tienen síntomas específicos del SNC; dichos trastornos incluyen, pero no se limitan a: enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry, mucopolisacaridosis (tipos I, II, III, IV, V, VI y VII), glucogenosis, gangliosidosis GM1, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Farber, leucodistrofia de Canavan y lipofuscinosis cerioide neuronal, tipos 1 y 2, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Pompe y enfermedad de Krabbe.

Para una enfermedad de almacenamiento lisosómico, se puede seleccionar un fármaco neurológico que por sí mismo o de otro modo imite a la actividad de la enzima que está alterada en la enfermedad. Las enzimas recombinantes ejemplares para el tratamiento de enfermedad de almacenamiento lisosómico incluyen, pero no se limitan a, las expuestas, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. 2005/0142141 (es decir, alfa-L20 iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, N-sulfatasa, alfa-N-acetilglucosaminidasa, N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa, beta-galactosidasa, aril sulfatasa B, beta-glucuronidasa, alfa glucosaminidasa ácida, glucocerebrosidasa, alfa-galactosidasa A, hexosaminidasa A, esfingomielinasa ácida, beta-galactocerebrosidasa, beta-galactosidasa, arilsulfatasa A, ceramidasa ácida, aspartoacilasa, palmitoilproteína tioesterasa 1 y tripeptidilaminopeptidasa 1).

En un aspecto, se usa un anticuerpo de la invención para detectar un trastorno neurológico antes del inicio de los síntomas y/o para evaluar la gravedad o duración de la enfermedad o trastorno. En un aspecto, el anticuerpo permite la detección y/o formación de imágenes del trastorno neurológico, incluyendo la formación de imágenes por radiografía, tomografía o resonancia magnética nuclear (RMN).

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-TfR de baja afinidad de la invención para su uso como



medicamento. En otros aspectos, se proporciona un anticuerpo anti-TfR de baja afinidad para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurológico (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer) sin agotar los glóbulos rojos (es decir, reticulocitos). En determinados modos de realización, se proporciona un anticuerpo anti-TfR de baja afinidad modificado para su uso en un procedimiento de tratamiento como se describe en el presente documento. En determinados modos de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-TfR de baja afinidad modificado para mejorar su seguridad para su uso en un procedimiento de tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad o trastorno neurológico que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-TfR (opcionalmente acoplado a un fármaco para trastornos neurológicos). En un modo de realización de este tipo, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional. En otros modos de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-TfR modificado para mejorar su seguridad para su uso en la reducción o inhibición de la formación de placa de amiloide en un paciente en riesgo o que padece una enfermedad o trastorno neurológico (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer). Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es opcionalmente un ser humano. En determinados aspectos, el anticuerpo anti-TfR de la invención para su uso en los procedimientos de la invención mejora la captación del fármaco para trastornos neurológicos con el que está acoplado.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-TfR de baja afinidad de la invención en la fabricación o preparación de un medicamento. En un modo de realización, el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurológico. En otro modo de realización, el medicamento es para uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad o trastorno neurológico que comprende administrar una cantidad eficaz del medicamento a un individuo que tiene una enfermedad o trastorno neurológico. En un modo de realización de este tipo, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar la enfermedad de Alzheimer. En un modo de realización, el procedimiento comprende administrar a un individuo que tiene la enfermedad de Alzheimer una cantidad eficaz de un anticuerpo multiespecífico de la invención que se une tanto a BACE1 como a TfR o tanto a Abeta como a TfR. En un modo de realización de este tipo, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede ser un ser humano.

Los anticuerpos anti-TfR de la invención se pueden usar solos o bien en combinación con otros agentes en un tratamiento. Por ejemplo, el anticuerpo anti-TfR de la invención se puede coadministrar con al menos un agente terapéutico adicional. En determinados modos de realización, un agente terapéutico adicional es un agente terapéutico eficaz para tratar el mismo trastorno neurológico o uno diferente que el anticuerpo anti-TfR que se emplea para el tratamiento. Los agentes terapéuticos adicionales ejemplares incluyen, pero no se limitan a: los diversos fármacos neurológicos descritos anteriormente, inhibidores de la colinesterasa (tales como donepezilo, galantamina, rovastigmina y tacrina), antagonistas del receptor de NMDA (tales como memantina), inhibidores de la agregación del péptido amiloide beta, antioxidantes, moduladores de  $\gamma$ -secretasa, miméticos del factor de crecimiento nervioso (NGF) o tratamiento génico con NGF, agonistas de PPAR $\gamma$ , inhibidores de la HMS-CoA reductasa (estatinas), ampakinas, bloqueadores de los canales de calcio, antagonistas del receptor de GABA, inhibidores de la glucógeno sintasa cinasa, inmunoglobulina intravenosa, agonistas del receptor muscarínico, moduladores del receptor nicotínico, inmunización activa o pasiva frente al péptido amiloide beta, inhibidores de la fosfodiesterasa, antagonistas del receptor de serotonina y anticuerpos anti-péptido amiloide beta. En determinados modos de realización, el al menos un agente terapéutico adicional se selecciona por su capacidad de mitigar uno o más efectos secundarios del fármaco neurológico.

En determinados otros modos de realización de este tipo, el al menos un agente terapéutico adicional se selecciona por su capacidad de inhibir o prevenir la activación de la vía del complemento tras la administración del anticuerpo anti-TfR. Los ejemplos de dichos agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, agentes que interfieren en la capacidad del anticuerpo anti-TfR para unirse o activar la vía del complemento y agentes que inhiben una o más interacciones moleculares dentro de la vía del complemento, y se describen, en general, en Mollnes y Kirschfink (Molec. Immunol. 43 (2006) 107-121).

Dichas politerapias indicadas anteriormente y en el presente documento engloban la administración combinada (donde se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o en formulaciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención se puede producir antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente y/o adyuvante terapéutico adicional. En un modo de realización, la administración del anticuerpo anti-TfR y la administración de un agente terapéutico adicional se produce en aproximadamente un mes, o en aproximadamente una, dos o tres semanas, o en aproximadamente uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis días, entre sí. Los anticuerpos de la invención también se pueden usar en combinación con otros tratamientos de intervención, tales como, pero sin limitarse a, radioterapia, psicoterapia conductual u otros tratamientos conocidos en la técnica y apropiados para el trastorno neurológico que se va a tratar o prevenir.

Un anticuerpo anti-TfR de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) se puede administrar por cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. En el presente documento se contemplan diversas pautas posológicas incluyendo, pero sin limitarse a, administraciones únicas o múltiples durante diversos puntos temporales, administración en bolo e infusión pulsada.

Los anticuerpos de la invención se formularán, dosificarán y administrarán de forma consecuyente con las buenas prácticas médicas. Los factores para su consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos.

El anticuerpo no lo necesita, pero se puede formular opcionalmente con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión o para prevenir, mitigar o mejorar uno o más efectos secundarios de la administración de anticuerpos. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Estos se usan, en general, en las mismas dosificaciones y por las vías de administración como se describe en el presente documento, o aproximadamente de un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que sea apropiada.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, el tipo de anticuerpo, la gravedad y evolución de la enfermedad, si se administra el anticuerpo con propósitos preventivos o terapéuticos, tratamiento previo, anamnesis del paciente y respuesta al anticuerpo y el criterio del médico especialista. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosificación candidata inicial para su administración al paciente, ya sea, por ejemplo, por una o más administraciones separadas, o por infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, en general, se mantendría el tratamiento hasta que se produjera una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación ejemplar del anticuerpo estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg. Por tanto, se pueden administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, 5,0 mg/kg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg o 40 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar de forma intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente recibe de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Se puede administrar una mayor dosis de carga inicial, seguido de una o más dosis menores. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. Se apreciará que un procedimiento para reducir el impacto sobre las poblaciones de reticulocitos por administración de anticuerpos anti-TfR es modificar la cantidad o el momento de las dosis de modo que estén presentes menores cantidades globales de anticuerpo circulante en la circulación sanguínea para interactuar con los reticulocitos. En un ejemplo no limitante, se puede administrar una menor dosis de los anticuerpos anti-TfR con mayor frecuencia de lo que sería una mayor dosis. La dosificación usada se puede equilibrar entre la cantidad de anticuerpo necesaria para administrarse al SNC (relacionada por sí misma con la afinidad de la porción específica de antígeno del SNC del anticuerpo), la afinidad de ese anticuerpo por TfR y si se administra(n) o no conjuntamente o en serie compuesto(s) protector(es) de los glóbulos rojos (es decir, reticulocitos), estimulante(s) del crecimiento y desarrollo, o inhibidor(es) de la vía del complemento con el anticuerpo. La evolución de este tratamiento se supervisa fácilmente por técnicas y ensayos convencionales como se describe en el presente documento y como se conoce en la técnica.

Se entiende que se puede llevar a cabo cualquiera de las formulaciones o procedimientos terapéuticos anteriores usando un inmunoc conjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-TfR.

### III. Artículos de fabricación

En otro aspecto, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una ficha técnica o prospecto del envase en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas, bolsas de solución i.v., etc. Los recipientes se pueden formar a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que por sí misma o combinada con otra composición es eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y que puede tener una vía de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial

que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo de la invención. La ficha técnica o prospecto de envase indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente citotóxico o de otro modo terapéutico adicional. El artículo de fabricación en este modo de realización de la invención puede comprender además un prospecto del envase que indique que las composiciones se pueden usar para tratar una afección particular. De forma alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (BWF), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

Se entiende que cualquiera de los artículos de fabricación anteriores puede incluir un inmunoconjugado de la invención en lugar o además de un anticuerpo anti-receptor de transferrina.

#### IV. EJEMPLOS

Los siguientes son ejemplos de composiciones y procedimientos de la invención. Se entiende que se pueden practicar otros diversos modos de realización, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

#### Materiales y procedimientos

##### Técnicas de ADN recombinante

Se usaron procedimientos estándar para manipular el ADN como se describe en Sambrook, J. *et al.*, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Se usaron los reactivos biológicos moleculares de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

##### Síntesis de genes y oligonucleótidos

Se prepararon los segmentos de genes deseados por síntesis química en Genart GmbH (Ratisbona, Alemania). Los fragmentos génicos sintetizados se clonaron en un plásmido de *E. coli* para propagación/amplificación. Las secuencias de ADN de los fragmentos de genes subclonados se verificaron por secuenciación de ADN. De forma alternativa, se ensamblaron fragmentos cortos de ADN sintético por hibridación de oligonucleótidos sintetizados químicamente o por medio de PCR. Los oligonucleótidos respectivos fueron preparados en metabion GmbH (Planegg-Martinsried, Alemania).

##### Reactivos

Todos los productos químicos comerciales, anticuerpos y kits se usaron como se proporcionaron de acuerdo con el protocolo del fabricante, si no se indica de otro modo.

#### Ejemplo 1

##### Inmunización de conejos y ratones

##### Inmunización de ratones

Se inmunizaron genéticamente ratones NMRI, usando un vector de expresión plasmídico que codifica TfR humano o de macaco cangrejero de longitud completa por aplicación intradérmica de 100 µg de ADN de vector, seguido de electroporación (2 pulsos cuadrados de 1000 V/cm, duración de 0,1 ms, intervalo de 0,125 s; seguido de 4 pulsos cuadrados de 287,5 V/cm, duración de 10 ms, intervalo de 0,125 s. Los ratones recibieron 6 o bien 7 inmunizaciones consecutivas en los días 0, 14, 28, 42, 56, 70 y 84. Las cuarta y sexta inmunizaciones se realizaron con el vector que codifica TfR de macaco cangrejero; el vector que codifica TfR humano se usó para todas las demás inmunizaciones. Se extrajo sangre los días 36, 78 y 92 y se preparó suero, que se usó para la determinación de valores por ELISA (véase a continuación). Los animales con los valores más altos se seleccionaron para el refuerzo el día 96, por inyección intravenosa de 10<sup>6</sup> células de TF-1 humanas o 50 µg de TfR soluble humano recombinante que carece del dominio helicoidal (dominio extracelular del TfR humano que comienza en Leu 122, termina en Asn608, expresado en células HEK293F como una fusión N terminal con la región Fc humana y purificado por cromatografía de afinidad con proteína A y cromatografía de exclusión por tamaño, y los anticuerpos monoclonales se aislaron por tecnología de hibridoma, en base a su capacidad de unirse al receptor de transferrina humano y de macaco cangrejero expresado en la superficie de células CHO-K1 transfectadas de forma estable (véase el ejemplo 3).

**Inmunización de conejos**

Se inmunizaron genéticamente conejos blancos de Nueva Zelanda o conejos transgénicos que expresaban un repertorio de anticuerpos humanizados, usando un vector de expresión plasmídico que codificaba el TfR humano o de macaco cangrejero de longitud completa, por aplicación intradérmica de 400 µg de ADN de vector, seguido de electroporación (5 pulsos cuadrados de 750 V/cm, duración de 10 ms, intervalo de 1 s). Los conejos recibieron 6 inmunizaciones consecutivas en los días 0, 14, 28, 56, 84 y 112. Las cuarta y sexta inmunizaciones se realizaron con el vector que codifica TfR de macaco cangrejero; el vector que codifica TfR humano se usó para todas las demás inmunizaciones. Se extrajo sangre (un 10 % de la volemia total estimada) en los días 35, 63, 91 y 119. Se preparó suero, que se usó para la determinación de los valores por ELISA (véase a continuación), y se aislaron células mononucleares periféricas, que se usaron como fuente de linfocitos B específicos de antígeno en el procedimiento de clonación con linfocitos B (véase el ejemplo 2).

**Determinación de valores séricos (ELISA)**

Se inmovilizó TfR soluble recombinante humano (R&D Systems, n.º de cat. 2474-TR) en una placa NUNC Maxisorb de 96 pocillos a 3 µg/ml, 100 µl/pocillo, en PBS, seguido de: bloqueo de la placa con CroteinC al 2 % en PBS, 200 µl/pocillo; aplicación de diluciones en serie de antisueros, por duplicado, en CroteinC al 0,5 % en PBS, 100 µl/pocillo; detección con (1) anticuerpo anti-IgG de ratón de cabra conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch/Dianova 115-036-071; 1/16 000) para todos los sueros de ratón, (2) anticuerpo anti-IgG de conejo de burro conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch/Dianova 711-036-152; 1/16 000) para todos los sueros de conejo, (3) anticuerpo anti-IgG humana de conejo (Pierce/Thermo Scientific 31423; 1/5000) solo para sueros de conejos transgénicos, (4) anticuerpo anti-kappa humana de cabra biotinilado (Southern Biotech/Biozol 2063-08, 1/5000) y estreptavidina-HRP solo para sueros de conejos transgénicos; diluido en CroteinC al 0,5 % en PBS, 100 µl/pocillo. Para todas las etapas, las placas se incubaron durante 1 h a 37 °C. Entre todas las etapas, las placas se lavaron 3 veces con Tween 20 al 0,05 % en PBS. Se desarrolló la señal por adición de BM Blue POD Substrate soluble (Roche), 100 µl/pocillo; y se detuvo por adición de HCl 1 M, 100 µl/pocillo. Se leyó la absorbancia a 450 nm, frente a 690 nm como referencia. Se definió el valor como la dilución de antisueros dando como resultado una señal semimáxima.

**Ejemplo 2****Clonación de linfocitos B de conejos****Aislamiento de leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) de conejo**

Se tomaron muestras de sangre de, en resumen, 6 animales (2 conejos naturales (wt) y 4 conejos transgénicos (tg)). Estos conejos derivaron de 2 campañas de inmunización diferentes: primera campaña con 2 conejos wt y 2 tg y segunda campaña con 2 conejos tg (véase también el ejemplo "Inmunización de conejos"). Se diluyó dos veces la sangre entera que contenía EDTA con 1x PBS (PAA, Pasching, Austria) antes de la centrifugación por densidad usando Lympholyte Mammal (Cedarlane Laboratories, Burlington, Ontario, Canadá) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las PBMC se lavaron dos veces con 1x PBS.

**Medio EL-4 B5**

RPMI 1640 (Pan Biotech, Aidenbach, Alemania) complementado con FCS al 10 % (Hyclone, Logan, UT, EE. UU.), glutamina 2 mM, solución de penicilina/estreptomina al 1 % (PAA, Pasching, Austria), piruvato de sodio 2 mM, HEPES 10 mM (PAN Biotech, Aidenbach, Alemania) y β-mercaptoetanol 0,05 mM (Gibco, Paisley, Escocia)

**Disminución de células**

Primera campaña de vacunación: se usaron placas de 6 pocillos estériles (grado de cultivo celular) cubiertas con una monocapa confluyente de células CHO para agotar los macrófagos/monocitos a través de adhesión inespecífica, así como linfocitos que no se unen específicamente.

Segunda campaña de vacunación: se omitió la etapa de disminución usando pocillos cubiertos con células CHO, puesto que no se pudo excluir que se agotarían los linfocitos B que producen anticuerpos que son de reacción cruzada con los anticuerpos frente al receptor de transferrina de hámster. Por lo tanto, se usaron placas de 6 pocillos estériles en blanco (grado de cultivo celular) para agotar los macrófagos y monocitos a través de una adhesión inespecífica que posibilita a los linfocitos B potenciales que producen anticuerpos de superficie de reacción cruzada de hámster (y posiblemente de reacción cruzada de ratón) a alcanzar la siguiente etapa en el flujo de trabajo.

Para cada campaña de inmunización: cada pocillo se llenó como máximo con 4 ml de medio y hasta 6x10<sup>6</sup> de PBMC del conejo inmunizado y se dejó que se unieran durante 1 h a 37 °C en la estufa de incubación. Se usaron las células en el sobrenadante (linfocitos de sangre periférica (PBL)) para la etapa de selección de antígeno.

**Enriquecimiento de linfocitos B en el receptor de transferrina humano**

Se sembraron placas de cultivo tisular de 6 pocillos cubiertas con una monocapa de células CHO positivas para el receptor de transferrina humano con hasta  $6 \times 10^6$  PBL por 4 ml de medio y se dejó que se unieran durante 1 h a 37 °C en la estufa de incubación. Las células no adherentes se retiraron lavando cuidadosamente los pocillos 1-2 veces con 1x PBS. Las células adherentes restantes se desprendieron por tripsina durante 10 min a 37 °C en la estufa de incubación. La tripsinización se detuvo con medio EL-4 B5. Las células se mantuvieron en hielo hasta la tinción con inmunofluorescencia.

**10 Tinción con inmunofluorescencia y citometría de flujo**

Se usó anti-IgG con FITC (AbD Serotec, Dusseldorf, Alemania) para la separación de células sueltas. Para la tinción superficial, se incubaron las células de la etapa de reducción y enriquecimiento con el anticuerpo anti-IgG con FITC en PBS y se incubaron durante 45 min en oscuridad a 4 °C. Después de la tinción, se lavaron dos veces las PBMC con PBS enfriado en hielo. Finalmente, los PBMC se resuspendieron en PBS enfriada con hielo y se sometieron de inmediato a los análisis por FACS. Se añadió yoduro de propidio en una concentración de 5 µg/ml (BD Pharmingen, San Diego, CA, EE. UU.) antes de los análisis por FACS para discriminar entre células vivas y muertas.

20 Se usaron un Becton Dickinson FACSAria equipado con un ordenador y el programa informático FACSDiva (BD Biosciences, EE. UU.) para la separación de células sueltas.

**Cultivo de linfocitos B**

25 El cultivo de los linfocitos B de conejo se preparó mediante un procedimiento similar al descrito por Zubler *et al.* (1985). En resumen, se incubaron linfocitos B de conejo separados sueltos en placas de 96 pocillos con 200 µl/pocillo de medio EL-4 B5 que contenía células Pansorbin (1:100000) (Calbiochem (Merck), Darmstadt, Alemania), sobrenadante de timocitos de conejo al 5 % (carga TSN-M13 (10242), MicroCoat, Bernried, Alemania) y células de timoma EL-4-B5 murinas irradiadas con rayos gamma ( $2,5 \times 10^4$ /pocillo) durante 7 días a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % en la estufa de incubación. Los sobrenadantes del cultivo de linfocitos B se retiraron para el cribado y se recogieron de inmediato las células restantes y se congelaron a -80 °C en 100 µl de tampón RLT (Qiagen, Hilden, Alemania).

**Ejemplo 3****Identificación de anticuerpos de unión a TfR humano y de macaco cangrejero por ELISA celular**

Para cribar sobrenadantes de hibridoma de ratón o de linfocitos B de conejo para determinar anticuerpos que reconozcan el TfR humano y de macaco cangrejero, se empleó un ELISA celular usando células CHO-K1 transfectadas de forma estable. Se obtuvieron transfectantes estables transfectando células CHO-K1 con plásmidos de expresión que contenían casetes de expresión para el TfR humano o de macaco cangrejero, así como para la neomicin-fosfotransferasa. Después de la transfección, las células se diluyeron en medio de cultivo que contenía 500 µg/ml de G418 (Life Technologies). Después de la aparición de clones en crecimiento, las células se separaron, se tiñeron con MEM-75 (Abcam) o 13E4 (Life Technologies) y anticuerpos secundarios marcados con PE para TfR humano o de macaco cangrejero, y las células altamente fluorescentes se separaron como células sueltas en pocillos de una placa de 96 pocillos (FACS Aria). Después de 7 días de cultivo, se comprobaron de nuevo los clones para determinar la expresión de TfR en los clones y se seleccionaron los clones de mejor expresión para los experimentos de ELISA celular.

50 En resumen, se sembraron 15.000 células por pocillo de una placa de 384 pocillos y se incubaron durante 18 h a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %. El sobrenadante se retiró usando un lavador automatizado (BIOTEK) y se añadieron 30 µl de sobrenadante que contenía anticuerpo a cada pocillo, seguido de 24 µl de medio de cultivo. Después de 2 horas de incubación, se vaciaron los pocillos y se añadieron 30 µl de glutaraldehído al 0,05 % en PBS durante 45 min a TA. Después de 3 lavados con PBS/Tween20 al 0,025 % (PBST), se añadieron 30 µl de HRP anti-IgG de conejo o HRP anti-IgG de ratón (Southern Biotech) diluido 1:5000 en tampón de bloqueo y se incubaron las placas durante 1 hora a TA. Los pocillos se lavaron 6 veces con PBST y la señal se generó usando 30 µl de TMB por pocillo y se midió la absorbancia a 450 nm.

**Ejemplo 4****Clonación y expresión de anticuerpos anti-TfR****Técnicas de ADN recombinante**

65 Se usaron procedimientos estándar para manipular el ADN como se describe en Sambrook, J. *et al.*, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Se

usaron los reactivos biológicos moleculares de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### Síntesis de genes y oligonucleótidos

5 Se prepararon los segmentos de genes deseados por síntesis química en Geneart GmbH (Ratisbona, Alemania). Los fragmentos génicos sintetizados se clonaron en un plásmido de *E. coli* para propagación/amplificación. Las secuencias de ADN de los fragmentos de genes subclonados se verificaron por secuenciación de ADN. De forma alternativa, se ensamblaron fragmentos cortos de ADN sintético por hibridación de oligonucleótidos sintetizados químicamente o por medio de PCR. Los oligonucleótidos respectivos fueron preparados en metabion GmbH  
10 (Planegg-Martinsried, Alemania).

### Amplificación por PCR de dominios V

15 El ARN total se preparó a partir del lisado de linfocitos B (resuspendido en tampón RLT - Qiagen- n.º de cat. 79216) usando el kit de ARN NucleoSpin 8/96 (Macherey&Nagel; 740709.4, 740698) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se eluyó el ARN con 60 µl de agua libre de RNasa. Se usaron 6 µl de ARN para generar ADNc por reacción de retrotranscriptasa usando el Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen 18080-400) y un cebador oligo-dT de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todas las etapas se realizaron en un sistema Hamilton ML Star. Se usaron 4 µl de ADNc para amplificar las regiones variables de la cadena ligera y pesada (VH y VL) de inmunoglobulina con AccuPrime SuperMix (Invitrogen 12344-040) en un volumen final de 50 µl usando los cebadores rbHC.up y rbHC.do para la cadena pesada, rbLC.up y rbLC.do para la cadena ligera de linfocitos B de conejo natural y BcPCR\_FHLC\_leader.fw y BcPCR\_huCkappa.rev para la cadena ligera de linfocitos B de conejo transgénico (véase la tabla a continuación). Todos los cebadores directos eran específicos para el péptido señal (de VH y VL respectivamente) mientras que los cebadores inversos eran específicos para las regiones constantes (de VH y VL respectivamente). Las condiciones de PCR para RbVH+RbVL fueron como sigue: inicio en caliente a 94 °C durante 5 min; 35 ciclos de 20 s a 94 °C, 20 s a 70 °C, 45 s a 68 °C, y una extensión final a 68 °C durante 7 min. Las condiciones de PCR para HuVL fueron como sigue: inicio en caliente a 94 °C durante 5 min; 40  
25 ciclos de 20 s a 94 °C, 20 s a 52 °C, 45 s a 68 °C, y una extensión final a 68 °C durante 7 min.

rbHC.up (SEQ ID NO: 103)	AAGCTTGCCACCATGGAGACTGGGCTGCGCTG GCTTC
rbHCf.do (SEQ ID NO: 104)	CCATTGGTGAGGGTGCCCGAG
rbLC.up (SEQ ID NO: 105)	AAGCTTGCCACCATGGACAYGAGGGCCCCCAC TC
rbLC.do (SEQ ID NO: 106)	CAGAGTRCTGCTGAGGTTGTAGGTAC
BcPCR_FHLC_leader.fw (SEQ ID NO: 107)	ATGGACATGAGGGTCCCCGC
BcPCR_huCkappa.rev (SEQ ID NO: 108)	GATTTCAACTGCTCATCAGATGGC

30 Se cargaron 8 µl de 50 µl de solución de PCR en un 48 E-Gel al 2 % (Invitrogen G8008-02). Las reacciones de PCR positivas se limpiaron usando el kit NucleoSpin Extract II (Macherey&Nagel; 740609250) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se eluyeron en 50 µl de tampón de elución. Todas las etapas de limpieza se realizaron en un sistema Hamilton ML Starlet.

### 35 Expresión recombinante de anticuerpos bivalentes monoclonales de conejo

Para la expresión recombinante de anticuerpos bivalentes monoclonales de conejo, los productos de PCR que codifican VH o VL se clonaron como ADNc en vectores de expresión por el procedimiento de clonación con protuberancia (RS Haun *et al.*, BioTechniques (1992) 13, 515-518; MZ Li *et al.*, Nature Methods (2007) 4, 251-256). Los vectores de expresión contenían un casete de expresión que consistía en un promotor de CMV en 5' que incluía el intrón A y una secuencia de poliadenilación de BGH en 3'. Además del casete de expresión, los plásmidos contenían un origen de replicación derivado de pUC18 y un gen de beta-lactamasa que confería resistencia a ampicilina para la amplificación del plásmido en *E. coli*. Se usaron tres variantes del plásmido básico: un plásmido que contiene la región constante de IgG de conejo diseñado para aceptar las regiones VH mientras que dos plásmidos adicionales que contienen la región constante LC kappa de conejo o humana para aceptar las regiones VL.  
45

Los plásmidos de expresión linealizados que codifican la región constante kappa o gamma y los insertos VL/VH se amplificaron por PCR usando cebadores solapantes.  
50

Se incubaron productos de PCR purificados con ADN-polimerasa T4 lo que generó protuberancias monocatenarias. Se detuvo la reacción por la adición de dCTP.

En la siguiente etapa, se combinaron el plásmido y el inserto y se incubaron con *recA*, lo que indujo la recombinación específica de sitio. Los plásmidos recombinados se transformaron en *E. coli*. Al día siguiente, se recogieron las colonias cultivadas y se sometieron a prueba para determinar el plásmido recombinado correcto por preparación del plásmido, análisis de restricción y secuenciación de ADN.

Para la expresión de anticuerpos, se cotransfectaron transitoriamente los plásmidos de HC y LC aislados en células HEK293 y se recogieron los sobrenadantes después de 1 semana.

#### 10 **Generación de vectores para la expresión de anticuerpos monovalentes monoclonales de conejo**

Para la expresión recombinante de candidatos seleccionados como anticuerpos monovalentes monoclonales, las regiones constantes de conejo de todas las cadenas VH se convirtieron en regiones constantes humanas que encerraban la mutación de botón en el segmento CH3. Para las cadenas VL derivadas de linfocitos B naturales de conejo, las regiones constantes kappa de C de conejo se convirtieron en humanas. Se usaron 4 µl de ADNc de los candidatos seleccionados para amplificar las regiones variables de la cadena ligera y pesada de inmunoglobulina con AccuPrime SuperMix (Invitrogen 12344-040) en un volumen final de 50 µl con cebadores directos específicos para el péptido señal y cebadores inversos específicos para la región CDR3-J con secuencia de solapamiento (en el extremo 3') (20 pb) homóloga a las regiones constantes humanas (respectivamente de VH y VL). Las condiciones de PCR para la amplificación de las cadenas VH y VL fueron como sigue: inicio en caliente a 94 °C durante 5 min; 35 ciclos de 20 s a 94 °C, 20 s a 68 °C, 45 s a 68 °C, y una extensión final a 68 °C durante 7 min.

Los productos de PCR que codifican VH o VL se clonaron como ADNc en vectores de expresión por el procedimiento de clonación con protuberancia (RS Haun *et al.*, BioTechniques (1992) 13, 515-518; MZ Li *et al.*, Nature Methods (2007) 4, 251-256). Los vectores de expresión contenían un casete de expresión que consistía en un promotor de CMV en 5' que incluía el intrón A y una secuencia de poliadenilación de BGH en 3'. Además del casete de expresión, los plásmidos contenían un origen de replicación derivado de pUC18 y un gen de beta-lactamasa que confería resistencia a ampicilina para la amplificación del plásmido en *E. coli*. Se usaron dos variantes del plásmido básico: un plásmido que contiene la región constante de IgG humana diseñado para aceptar la nueva cadena VH amplificada y un segundo plásmido que contiene la región constante LC kappa humana para aceptar la cadena VL.

Los plásmidos de expresión linealizados que codifican la región constante kappa o gamma y los insertos VL/VH se amplificaron por PCR usando cebadores solapantes.

Se incubaron productos de PCR purificados con ADN-polimerasa T4 lo que generó protuberancias monocatenarias. Se detuvo la reacción por la adición de dCTP.

En la siguiente etapa, se combinaron el plásmido y el inserto y se incubaron con *recA*, lo que indujo la recombinación específica de sitio. Los plásmidos recombinados se transformaron en *E. coli*. Al día siguiente, se recogieron las colonias cultivadas y se sometieron a prueba para determinar el plásmido recombinado correcto por preparación del plásmido, análisis de restricción y secuenciación de ADN.

#### 45 **Ejemplo 5**

##### **Expresión transitoria de los anticuerpos anti-TfR monovalentes**

Los anticuerpos se generaron *in vivo* en células HEK293 transfectadas transitoriamente (línea celular 293 derivada de riñón embrionario humano) cultivadas en medio F17 (Invitrogen Corp.). Para la transfección se usó el reactivo de transfección "libre de 293" (Novagen). Los anticuerpos y las moléculas modificadas basadas en anticuerpos como se describe anteriormente se expresaron a partir de plásmidos de expresión individuales. Se realizaron las transfecciones como se especificaba en las instrucciones del fabricante. Los sobrenadantes de cultivo celular que contenían proteína recombinante se recogieron de tres a siete días después de la transfección. Los sobrenadantes se almacenaron a temperatura reducida (por ejemplo, -80 °C) hasta la purificación.

La información general con respecto a la expresión recombinante de inmunoglobulinas humanas, por ejemplo, en células HEK293, se da en: Meissner, P. *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-203.

#### 60 **Ejemplo 6**

##### **Purificación de anticuerpos frente al receptor de transferrina de un brazo en alto rendimiento**

Los 50 ml de sobrenadantes clarificados que contenían anticuerpos de un brazo en placas de 96 pocillos profundos se cargaron en columnas MabSelectSuRe de 200 µl. Después de las etapas de lavado con PBS a pH 7,4, las proteínas se eluyeron con HCl 2,5 mM usando el sistema Tecan/Atoll dando como resultado 0,5 ml de eluido. El eluido se neutralizó con Tris 2 M, pH 8. Las proteínas purificadas se cuantificaron usando un espectrofotómetro

Nanodrop y se analizaron por CE-SDS en condiciones de desnaturalización y reductoras y SEC analítica. Para obtener proteína con alta pureza (>95 %), una gran proporción de los anticuerpos se tienen que purificar además en cromatografía de exclusión por tamaño para separarse de la mitad del anticuerpo, anticuerpos ojal-oyal y agregados superiores. En lo que sigue, se inyectaron 500 µl de las muestras en Superdex200 10/300GL en histidina 20 mM que contenía NaCl 140 mM, pH 6,0, usando Dionex UltiMate 3000. Este procedimiento permite fraccionar 25-30 muestras/día y, por lo tanto, permite refinar un gran número de resultados de cribado en formato de un brazo. Las fracciones se agruparon y analizaron de nuevo como se describe anteriormente.

### Ejemplo 7

#### Cultivo de células hCMEC/D3 para ensayos de transcitosis

El medio y los complementos para hCMEC/D3 (Weksler, B. B. *et al.*, FASEB J. 19 (2005), 1872-1874) se obtuvieron de Lonza. Se cultivaron células hCMEC/D3 (pases 26-29) hasta la confluencia en cubreobjetos recubiertos con colágeno (microscopia) o matraces en medio EBM2 que contenía FBS al 2,5 %, una cuarta parte de los factores de crecimiento administrados y completamente complementados con hidrocortisona, gentamicina y ácido ascórbico administrados.

Para todos los ensayos de transcitosis, se usaron insertos de filtro de membrana de PET (0,4 µm, diámetro de 12 mm) con alta densidad de poros (1x10<sup>8</sup> poros/cm<sup>2</sup>) en placas de cultivo celular de 12 pocillos. Los volúmenes de medio óptimos se calcularon para ser de 400 µl y 1600 µl para las cámaras apicales y basolaterales, respectivamente. Las cámaras apicales de los insertos de filtro se recubrieron con colágeno de cola de rata I (7,5 µg/cm<sup>2</sup>) seguido de fibronectina (5 µg/ml), durando cada incubación 1 hora a TA. Las células hCMEC/D3 se cultivaron en monocapas confluentes (aprox. 2x10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup>) durante 10-12 días en medio EBM2.

### Ejemplo 8

#### Ensayo de transcitosis de anticuerpos monovalentes

Todo el ensayo se realizó en medio EBM2 libre de suero que, de otro modo, se reconstituyó como se describe en el ejemplo 1. Los insertos de filtro con células se incubaron apicalmente con anticuerpos monovalentes (concentración: 2,67 µg/ml) durante 1 hora a 37 °C, después de lo que se obtuvieron todos los medios apicales y basolaterales. A partir de estos valores, se calculó el flujo paracelular. Las monocapas se lavaron a TA en medio libre de suero apicalmente (400 µl) y basolateralmente (1600 µl) 3 x 3-5 min cada una. Se obtuvieron todos los lavados para supervisar la eficacia de la retirada del anticuerpo no unido. Se añadió medio precalentado a la cámara apical y los filtros se transfirieron a una placa de 12 pocillos reciente (bloqueada durante la noche con PBS que contenía BSA al 1 %) que contenía 1600 µl de medio precalentado. En este punto, las células en los filtros se lisaron en 500 µl de tampón RIPA para determinar la captación de anticuerpos específicos. Los filtros restantes se incubaron a 37 °C y se obtuvieron muestras a diversos puntos de tiempo para determinar la liberación apical y/o basolateral del anticuerpo. El contenido de anticuerpo en las muestras se cuantificó usando un ELISA de IgG altamente sensible (véase el ejemplo 3). Para cada punto de tiempo, se generaron datos a partir de tres cultivos celulares de filtro.

### Ejemplo 9

#### ELISA de IgG sensible después del ensayo de transcitosis

Todo el procedimiento se realizó a TA usando un lavador automatizado para las etapas de lavado. Se recubrió una placa de 384 pocillos con 30 µl/pocillo de 1 µg/ml de anti-IgG humana/de ratón, específico de Fcγ en PBS durante 2 horas, seguido de 1 hora de incubación en tampón de bloqueo PBS que contenía BSA al 1 % o CroteínaC al 1 % para ensayos de IgG humana y de ratón, respectivamente). Se añadieron a la placa muestras diluidas en serie del ensayo de transcitosis y las concentraciones estándar del anticuerpo usado en el ensayo de transcitosis y se incubaron durante 2 horas. Después de cuatro lavados, se añadieron 30 µl/pocillo de 50 ng/ml de anti-F(ab)<sub>2</sub> humano/de ratón-biotina en tampón de bloqueo y se incubó durante otras 2 horas. Después de 6 lavados, se añadieron 30 µl/pocillo de 50 ng/ml (ensayo de hulgG) o 100 ng/ml (ensayo de mIgG) de poli-HRP40-estreptavidina (Fitzgerald; en PBS que contenía BSA al 1 % y Tween-20 al 0,05 %) y se incubó durante 30 min. Después de 4 lavados, los inmunocomplejos se detectaron por adición de 30 µl/pocillo de sustrato de quimioluminiscencia BM (Roche). La señal de luminiscencia se midió usando un lector de placas de luminiscencia y se calculó la concentración usando la curva estándar ajustada. La sensibilidad del ensayo varió de 10 pg/ml a 10 ng/ml.

### Ejemplo 10

#### Cartografía de epítomos por ELISA celular de células CHO transfectadas con mutantes de hTfR

Para poder determinar las regiones de epítomo en el receptor de transferrina humano (hTfR), se introdujeron mutaciones en la secuencia de hTfR en posiciones donde una agrupación de aminoácidos expuestos en superficie



tenía diferentes aminoácidos en la secuencia de TfR de ratón alineada (véase la tabla a continuación), siguiendo el razonamiento de que, a pesar de la significativa homología entre el TfR humano y de ratón (77 % de identidad), no son conocidos anticuerpos dirigidos a la parte extracelular que muestren buena reactividad cruzada entre ambos ortólogos. La clonación de plásmidos con las mutaciones correspondientes se describe anteriormente. Para cartografiar la unión de las proteínas de unión para TfR humano a esos epítomos, se transfectaron transitoriamente células CHO-K1 con los plásmidos descritos y se midió la unión a anticuerpo en un ELISA celular. En resumen, 10<sup>4</sup> células se sembraron en placa por pocillo de una placa de 96 pocillos el día antes del experimento en medio de cultivo normal (RPMI/FCS al 10 %). Al otro día, el medio se cambió a OPTI-MEM Serum-Reduced Medium (Gibco), y se añadieron 10 µl de una mezcla de 1200 µl de OPTI-MEM, 12 µg de ADN plasmídico y 12 µl de reactivo de transfección XtremeGENE (Roche) a los pocillos después de 30 minutos de preincubación. Las células se incubaron durante 2 días a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 7,5 %, a continuación, se retiró el medio y se añadieron anticuerpos frente a TfR a concentraciones entre 1 nM y 100 nM en medio de cultivo, seguido de 2 h de incubación a 4 °C. Posteriormente, las soluciones de anticuerpos se reemplazaron por glutaraldehído al 0,05 % en PBS y las células se fijaron durante 15 min a TA, a continuación, se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con anticuerpo secundario anti-Fc humano conjugado con HRP (BioRad; 1:2000 en reactivo de bloqueo de ELISA (Roche)) durante 1,5 horas a TA. La señal se generó después de 3 lavados con PBS usando 50 µl de TMB por pocillo y se midió la absorbancia a 450 nm.

Plásmido n.º	mutaciones en hTfR
10188	
18909	Thr518Asp/Gln520Lys/Phe521Ser/Gln524Arg
18910	Arg325Gln
18911	Ser355Ala/Asp356Arg/Lys358Asn/Thr359Ile
18912	Asp204Gln/Lys205Ser/Arg208Asn
18913	Lys574Gly/Glu575Ala/Ile577Thr/Glu578Gln
18914	Ala196Ile/Gln197Gly/Asn198Gln/Ser199Asn/Val200Met/Ile201Val/Ile202Thr/Val203Ile/Asp204Val/Lys205Gln/Asn206Ser/Gly207Asn/Arg208Gly/Leu209Asn/Val210Leu/Tyr211Asp/Leu212Pro
18974	Asp245Glu/Tyr247Ser/Thr248Tyr/Pro249Ser

## 20 Ejemplo 11

### Ensayo de unión basado en resonancia de plasmón superficial para la interacción TfR humano-anticuerpo

El experimento de unión se llevó a cabo en un BIAcore B4000 (GE Healthcare) equipado con un chip sensor C1 (GE Healthcare, n.º de cat. BR1005-35) pretratado con anticuerpo anti-Fab humano (GE Healthcare, n.º de cat. 28-9583-25) usando un procedimiento de química de acoplamiento de amina estándar de acuerdo con el manual del proveedor.

Para las mediciones cinéticas, la muestra de anticuerpo se inmovilizó aplicando un tiempo de contacto de 60 segundos y un caudal de 10 µl/min en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4, Tween 20 al 0,05 % a 25 °C. Se aplicó el receptor de transferrina humano recombinante con marca His6 (R&D systems, n.º de cat 2474-TR-050) en concentraciones crecientes y la señal se supervisó a lo largo del tiempo. Se registró un lapso de tiempo promedio de 150 segundos de tiempo de asociación y 600 segundos de tiempo de disociación a un caudal de 30 µl/min. Los datos se ajustaron usando un modelo de unión 1:1 (isoterma de Langmuir).

## 35 Ejemplo 12

### Humanización de los dominios VH y VL del anticuerpo anti-receptor de transferrina murino y de conejo

Los anticuerpos anti-receptor de transferrina no humanos se humanizaron como sigue: en base a la caracterización de secuencias codificantes y secuencias de aminoácidos que comprenden los dominios VH y VL de los anticuerpos anti-receptor de transferrina no humanos de la clase IgG1 con cadena ligera kappa, se generó por injerto de CDR un correspondiente anticuerpo anti-receptor de transferrina humanizado con mutaciones inversas/directas basadas en la combinación VH4\_3 y VK1\_10 de la región estructural de la estirpe germinal humana para el clon 299.

## 45 Ejemplo 13

### Procedimiento para determinar la afinidad por el receptor TfR humano/de macaco cangrejero

50 En este ejemplo se explica el procedimiento para la determinación de las afinidades por el receptor de transferrina humano para la comparación del comportamiento de disociación.

Para todos los análisis se usó el kit Biotin CAPture de GE Healthcare (instrucción 28-9242-34 AB). En primer lugar, el chip se rehidrató acoplándolo en el instrumento BIAcore T200. Después de eso, el chip se dejó en espera con el tampón de migración durante la noche. Para la preparación de la superficie, el reactivo Biotin CAPture se diluyó 1:100 en tampón de migración (1xPBS, complementado con NaCl 0,25 M). Esta solución se inyectó en las cubetas de lectura de 1 a 4 durante 360 s con un caudal de 2  $\mu$ l/min. A continuación, la superficie del sensor se acondicionó con tres inyecciones de un minuto de solución de regeneración proporcionada en el kit Biotin CAPture. Esto se tiene que hacer durante el procedimiento de acoplamiento o por primera vez o después del almacenamiento. Se debe inyectar una solución de receptor de transferrina monobiotinilado humano o de macaco cangrejero respectivamente 100 nM, en la cubeta de lectura 2 durante 30 s a un caudal de 10  $\mu$ l/min. Para la determinación de la afinidad se aplicaron inyecciones con seis concentraciones (500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 y 0 nM). Se inyectaron en la "cubeta de lectura con hu-TfR" (por ejemplo, cubeta de lectura 2 como se prepara como se explica anteriormente) con un tiempo de inyección de 180 s (asociación) y un caudal de 10  $\mu$ l/min. Después de la fase de disociación de 600 s, la superficie se regeneró de acuerdo con las instrucciones del fabricante con la solución de regeneración proporcionada en el kit Biotin CAPture y se llevó a cabo el siguiente ciclo.

Los datos cinéticos se evaluaron usando el programa informático de evaluación de BIAcore T200. Se tuvieron en cuenta especialmente las constantes de tasa de disociación de las diferentes proteínas de unión para receptor de transferrina humano después de la aplicación del modelo de unión 1:1 de Langmuir.

#### **Ejemplo 14**

##### **Clasificación relativa en B4000 de la disociación del receptor de transferrina humano/de macaco cangrejero**

Se montó un chip sensor CAP (proporcionado en el kit Biotin CAPture, serie S, n.º 28-9202-34 GE) en un sistema BIAcore B4000, normalizado y direccionado de manera hidrodinámica, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En el primer ciclo, el reactivo CAP (como se proporciona en el kit) se dirigió al punto 1, 2, 4 y 5 con un caudal de 10  $\mu$ l/min durante 300 s. La captura del receptor de transferrina humano tuvo lugar en el punto 1 (receptor de transferrina humano biotinilado) y el punto 5 (receptor de transferrina de macaco cangrejero biotinilado) con un caudal de 10  $\mu$ l/min y un tiempo de contacto de 30 s. Los receptores se diluyeron a una concentración de 50 nM con tampón de migración (1xPBS, n.º 28995084, GE Healthcare, complementado con NaCl 0,25 M). Los anticuerpos se inyectaron en todas las cubetas de lectura en una serie de concentraciones de 100 nM, 50 nM, 25 nM y 0 nM durante 180 s a una velocidad de flujo de 30  $\mu$ l/min. El tiempo de disociación se estableció en 300 s. La regeneración de todo el complejo a partir del chip CAP se ha realizado utilizando la solución de regeneración proporcionada en el kit Biotin CAPture (120 s con un caudal de 10  $\mu$ l/min). Para controlar la concentración de proteína activa se realizó un segundo ciclo en el punto 5 utilizando proteína A biotinilada (n.º P2165-2MG, Sigma) con un caudal de 10  $\mu$ l/min y un tiempo de contacto de 30 s. El punto 1 se mantuvo vacío en este ciclo de control. Los anticuerpos y la regeneración se trataron como en el ciclo 1. Los datos cinéticos pertinentes se calcularon usando el programa informático de evaluación de BIAcore B4000. La disociación del receptor de transferrina humano se ha determinado aplicando el ajuste de disociación 1:1.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> F. Hoffmann-La Roche AG
- 5 <120> ANTICUERPOS ANTI-RECEPTOR DE TRANSFERRINA CON AFINIDAD ADAPTADA
- <130> P32937
- <150> EP15173508.1
- 10 <151> 24-06-2015
- <150> EP15176084.0
- <151> 09-07-2015
- 15 <160> 97
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 20 <211> 122
- <212> PRT
- <213> Oryctolagus cuniculus
- <400> 1
- 25
- Gln Ser Met Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro  
 1 5 10 15
- Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala  
 20 25 30
- Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 35 40 45
- Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly  
 50 55 60
- Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr  
 65 70 75 80
- Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Tyr  
 85 90 95
- Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp Pro Trp  
 100 105 110
- Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120
- <210> 2
- <211> 122
- 30 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> VH de mAb anti-TfR 567 (=VH\_básico de 299 humanizado)

ES 2 908 009 T3

<400> 2

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

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

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

Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly  
50 55 60

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

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Tyr  
85 90 95

Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp Pro Trp  
100 105 110

Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

5

<210> 3  
<211> 124  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> variante de humanización de VH de 299-001

15

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

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

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

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

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln



ES 2 908 009 T3

Gln Ser Met Glu Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly Ser  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Pro Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

- 5 <210> 6
- <211> 124
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> variante de humanización de VH de 299-006

<400> 6

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

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

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

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

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln



ES 2 908 009 T3

<223> variante de humanización de VH de 299-008

<400> 8

Gln Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala  
 20 25 30  
 Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 35 40 45  
 Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly  
 5 50 55 60  
 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Tyr  
 85 90 95  
 Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp Pro Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 9

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> variante de humanización de VH de 299-009\_DANG

<400> 9

Gln Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
 20 25 30  
 Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly  
 35 40 45  
 Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly  
 50 55 60  
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln





ES 2 908 009 T3

<220>

<223> variante de humanización de VH de 299-009\_DAQG

<400> 11

5

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

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

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

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

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

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

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

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 12

<211> 124

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> variante de humanización de VH de 299-011

15

<400> 12

ES 2 908 009 T3

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

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

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

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

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

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

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

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

5 <210> 13  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> variante de humanización de VH de 299-012

<400> 13

ES 2 908 009 T3

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

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

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

Gly Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60

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

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

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

Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 14  
 <211> 125  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> variante de humanización de VH de 299-013

10 <400> 14

ES 2 908 009 T3

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

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

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

Gly Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

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

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

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

Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 15  
<211> 124  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> variante de humanización de VH de 299-015

<400> 15

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

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

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

Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
50 55 60

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys



ES 2 908 009 T3

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

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

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

Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
50 55 60

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

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
85 90 95

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

Pro Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 18  
<211> 125  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> variante de humanización de VH de 299-018

<400> 18

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

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

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

Gly Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu





ES 2 908 009 T3

Gln Ser Met Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr  
1 5 10 15

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

Met Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
35 40 45

Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Pro Ser Leu Lys Ser  
50 55 60

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

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
85 90 95

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

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

- 5 <210> 21
- <211> 124
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> variante de humanización de VH de 299-021
- <400> 21

Gln Ser Met Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr  
1 5 10 15

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

Met Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
35 40 45

Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser  
50 55 60

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys

15



ES 2 908 009 T3

<400> 23

Gln Ser Met Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala  
 20 25 30  
 Met Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 35 40 45  
 Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser  
 50 55 60  
 Arg Val Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Ser Leu Lys Leu Ser  
 65 70 75 80  
 Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Tyr  
 85 90 95  
 Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp Pro Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

5

<210> 24

<211> 122

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> variante de humanización de VH de 299-023\_DASG

15 <400> 24

Gln Ser Met Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala  
 20 25 30  
 Met Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 35 40 45  
 Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser  
 50 55 60  
 Arg Val Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Ser Leu Lys Leu Ser

ES 2 908 009 T3

65 70 75 80

Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Tyr  
85 90 95

Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Ser Gly Phe Asp Pro Trp  
100 105 110

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

5 <210> 25  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
10 <220>  
<223> variante de humanización de VH de 299-023\_DAQG  
  
<400> 25

Gln Ser Met Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr  
1 5 10 15

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

Met Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
35 40 45

Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser  
50 55 60

Arg Val Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Ser Leu Lys Leu Ser  
65 70 75 80

Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Tyr  
85 90 95

Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Gln Gly Phe Asp Pro Trp  
100 105 110

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

15 <210> 26  
<211> 110  
<212> PRT  
<213> Oryctolagus cuniculus  
  
20 <400> 26

ES 2 908 009 T3

Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly  
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30  
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Cys  
65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Cys Tyr Ser Ser Ser Asn  
85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys  
100 105 110

- 5 <210> 27
- <211> 110
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> VL de mAb anti-TfR 567 (=VL\_básico de 299 humanizado)
- <400> 27

Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly  
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Ser  
65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Ser Asn  
85 90 95

- 15 Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys  
100 105 110

ES 2 908 009 T3

<210> 28  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> variante de humanización de VL de 567\_PNYA

<400> 28

10

```

Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly
 1           5           10           15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20           25           30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile
 35           40           45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly
 50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Pro
 65           70           75           80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr Ala Ser Ser Asn
 85           90           95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100          105          110
    
```

<210> 29  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> variante de humanización de VL de 299-001

20

<400> 29

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20           25           30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35           40           45
    
```

Tyr Arg Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Ser Asn  
 85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

- <210> 30
- <211> 110
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 10 <223> variante de humanización de VL de 299-002\_SYS
- <400> 30

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Ser Asn  
 85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

- 15 <210> 31
- <211> 110
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 20 <220>
- <223> variante de humanización de VL de 299-003
- <400> 31

ES 2 908 009 T3

Ala Tyr Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Ser Asn  
85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

5 <210> 32  
<211> 110  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> variante de humanización de VL de 299-004

<400> 32

Ala Tyr Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Ser Asn  
85 90 95

15



ES 2 908 009 T3

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

5 <210> 33  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> variante de humanización de VL de 299-005  
 <400> 33

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Ser Asn  
 85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

15 <210> 34  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> variante de humanización de VL de 299-006\_SYS  
 <400> 34

ES 2 908 009 T3

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Ser Asn  
 85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

- <210> 35
- 5 <211> 110
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 10 <223> variante de humanización de VL de 299-007

<400> 35

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

ES 2 908 009 T3

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Ser Asn  
 85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 36  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> variante de humanización de VL de 299-008  
 <400> 36

10

Ala Tyr Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Ser Asn  
 85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 37  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> variante de humanización de VL de 299-009\_NYA  
 <400> 37

20

ES 2 908 009 T3

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr Ala Ser Ser Asn  
 85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

- 5 <210> 38
- <211> 110
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> variante de humanización de VL de 299-009\_SYA

<400> 38

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

15

ES 2 908 009 T3

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ala Ser Ser Asn  
 85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 39  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> variante de humanización de VL de 299-009\_NYS

<400> 39

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr Ser Ser Ser Asn  
 85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 40  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> variante de humanización de VL de 299-009\_GYS

<400> 40

ES 2 908 009 T3

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ser Ser Ser Asn  
 85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

- <210> 41
- 5 <211> 110
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 10 <223> variante de humanización de VL de 299-009\_CYS

<400> 41

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

ES 2 908 009 T3

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Cys Tyr Ser Ser Ser Asn  
 85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

5 <210> 42  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> variante de humanización de VL de 299-010

<400> 42

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Ser Asn  
 85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

15 <210> 43  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> variante de humanización de VL de 299-012\_HYS

<400> 43

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Ser Ser Asn  
85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

5

<210> 44  
<211> 110  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> variante de humanización de VL de 299-014

15

<400> 44

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45



ES 2 908 009 T3

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala  
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Ser Asn  
 85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 45  
 <211> 110  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> variante de humanización de VL de 299-015\_AYS

10 <400> 45

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Leu Ile Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala  
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Tyr Ser Ser Ser Asn  
 85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

15 <210> 46  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> variante de humanización de VL de 299-017\_TYS

<400> 46

ES 2 908 009 T3

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Ser Ser Asn  
85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 47

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 47

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Pro Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr  
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Ile Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asp Thr Lys Cys Asp Pro Lys Phe  
50 55 60

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

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

10

Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115

ES 2 908 009 T3

5 <210> 48  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> variante de VH de 494 D52A  
 10 <400> 48

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Val Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Pro Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr  
 20 25 30  
 Tyr Ile His Trp Val Ile Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Arg Ile Ala Pro Ala Asn Gly Asp Thr Lys Ser Asp Pro Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115

15 <210> 49  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> variante de VH de 494 D52L  
 <400> 49

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

ES 2 908 009 T3

Ser Val Lys Leu Ser Cys Pro Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr  
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Ile Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Arg Ile Leu Pro Ala Asn Gly Asp Thr Lys Ser Asp Pro Lys Phe  
 50 55 60

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

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

Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 50  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> variante de VH de 494 D31G

<400> 50

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Pro Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Gly Thr  
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Ile Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

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

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

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

ES 2 908 009 T3

Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 51  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> variante de VH de 494 L101A

<400> 51

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Pro Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr  
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Ile Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

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

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

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

Val Arg Asp Tyr Ala Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 52  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> variante de humanización de VH de 494-001

<400> 52

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr  
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Ile Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

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

Gln Val Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

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

Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 53  
 <211> 119  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> variante de humanización de VH de 494-002

10 <400> 53

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr  
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Ile Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

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

Gln Val Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

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

Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

5 <210> 54  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> variante de humanización de VH de 494-003  
 <400> 54

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr  
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Ile Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

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

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

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

Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

15 <210> 55  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> variante de humanización de VH de 494-004  
 <400> 55

25 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15

ES 2 908 009 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr  
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Ile Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 56  
 <211> 119  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 10 <223> variante de humanización de VH de 494-005  
 <400> 56

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr  
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Ile Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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



ES 2 908 009 T3

Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

5 <210> 57  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> variante de humanización de VH de 494-005  
 <400> 57

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr  
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Ile Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asp Thr Lys Ser Asp Pro Ser Leu  
 50 55 60

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

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

Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

15 <210> 58  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> variante de humanización de VH de 494-007  
 <400> 58

ES 2 908 009 T3

Glu Val Gln Leu Val 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 Asn Ile Lys Asp Thr  
                   20                    25                    30

Tyr Ile His Trp Val Ile Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                    40                    45

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

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

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

Val Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
                   100                    105                    110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

- 5 <210> 59
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Mus musculus

- 10 <400> 59

ES 2 908 009 T3

Lys Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly  
 1 5 10 15

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

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Glu Leu Leu Ile  
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Gln Thr Tyr Asn Tyr Pro Leu  
 85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105

<210> 60

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> variante de humanización de VL de 494-001

10

<400> 60

ES 2 908 009 T3

Lys Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr  
20 25 30

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Gln Thr Tyr Asn Tyr Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 61  
<211> 107  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> variante de humanización de VL de 494-002

<400> 61

Lys Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

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

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

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

ES 2 908 009 T3

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Gln Thr Tyr Asn Tyr Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 62  
<211> 107  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> variante de humanización de VL de 494-003

<400> 62

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Gln Thr Tyr Asn Tyr Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

15 <210> 63  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> variante de humanización de VL de 494-004

<400> 63

Lys Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Gln Thr Tyr Asn Tyr Pro Leu  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 64  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 64

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Arg Ile Asn Pro His Asn Gly Gly Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

5

10

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

5 <210> 65  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 65

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr  
35 40 45

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
65 70 75 80

10 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Asn Ser Tyr Pro Trp Thr  
85 90 95  
Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
100 105

15 <210> 66  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Oryctolagus cuniculus  
  
<400> 66

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr  
1 5

20 <210> 67  
<211> 5  
<212> PRT  
25 <213> Oryctolagus cuniculus  
  
<400> 67

Ser Tyr Ala Met Ser  
1 5

30 <210> 68  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 68

**Trp Ser Gly Gly Ser**  
 1 5

5

<210> 69  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Oryctolagus cuniculus

10

<400> 69

**Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly**  
 1 5 10 15

15

<210> 70  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20

<220>  
 <223> HVR-H2 de 299-000 de conejo G65S

<400> 70

**Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser**  
 1 5 10 15

25

<210> 71  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Oryctolagus cuniculus

30

<400> 71

**Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp**  
 1 5 10 15

**Pro**

35

<210> 72  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40

<220>  
 <223> HVR-H3 de 299-000 DASG

<400> 72

45

**Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Ser Gly Phe Asp**  
 1 5 10 15

**Pro**



<210> 73  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> HVR-H3 de 299-000 DAQG

10 <400> 73

**Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Gln Gly Phe Asp**  
**1 5 10 15**

**Pro**

15 <210> 74  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Oryctolagus cuniculus

20 <400> 74

**Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ser**  
**1 5 10**

25 <210> 75  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> HVR-L1 299-000 RAA

<400> 75

**Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala**  
**1 5 10**

35 <210> 76  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Oryctolagus cuniculus

40 <400> 76

**Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser**  
**1 5**

45 <210> 77  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Oryctolagus cuniculus

50 <400> 77

ES 2 908 009 T3

Gln Gln Cys Tyr Ser Ser Ser Asn Val Asp Asn Thr  
 1 5 10  
 <210> 78  
 <211> 12  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> HVR-L3 299-000 NYA  
 10 <400> 78  
 Gln Gln Asn Tyr Ala Ser Ser Asn Val Asp Asn Thr  
 1 5 10  
 15 <210> 79  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> VH de anticuerpo anti-CD20  
 <400> 79  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser  
 20 25 30  
 Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 25 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115  
 <210> 80  
 <211> 112  
 30 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL de anticuerpo anti-CD20

<400> 80

5

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn  
85 90 95

Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 81

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

10

Gln Val Glu Leu Val 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

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

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

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

15

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

Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr  
 100 105 110

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

<210> 82  
 <211> 108  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 82

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
 20 25 30

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

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

10 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu  
 65 70 75 80  
 Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ile Tyr Asn Met Pro  
 85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

15 <210> 83  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> VH de anticuerpo anti alfa-sinucleína humanizado 9E4  
 <400> 83

Glu Val Gln Leu Val 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

ES 2 908 009 T3

	20		25		30														
Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val				
	35						40					45							
Ala	Ser	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Asn	Val				
	50					55					60								
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr				
	65				70					75				80					
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys				
			85						90					95					
Ala	Arg	Gly	Gly	Ala	Gly	Ile	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val				
			100					105					110						
Thr	Val	Ser	Ser																
			115																

<210> 84  
 <211> 113  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> VL de anticuerpo anti alfa-sinucleína humanizado 9E4

10 <400> 84

ES 2 908 009 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ile Gln Thr Leu Leu Tyr Ser  
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys  
35 40 45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Lys Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80

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

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
100 105 110

**Lys**

<210> 85  
5 <211> 115  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 85

10

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

Ser Val Gln Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30

Trp Met Asn Trp Ile Lys Ala Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Ala Thr Asn Pro Asn Asn Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe  
50 55 60

ES 2 908 009 T3

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

Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Ser Gly Gly His Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Val Val Thr  
100 105 110

Val Ser Ala  
115

<210> 86  
<211> 112  
5 <212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 86

Asp Val Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Tyr Leu Ser Val Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe His Ser  
20 25 30

Lys Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

10 Pro Lys Leu Leu Ile Asn Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

Ser Gly Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser  
85 90 95

Ala His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg  
100 105 110

15 <210> 87  
<211> 115  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 87

ES 2 908 009 T3

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

Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Tyr  
 20 25 30

Ile His Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 35 40 45

Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Glu Lys Phe Lys  
 50 55 60

Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met  
 65 70 75 80

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

Arg Asp Gly Cys Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110

Thr Val Ser  
 115

<210> 88  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

5

<400> 88

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp  
 20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45

Lys Phe Leu Ile Cys Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala  
 50 55 60

10



ES 2 908 009 T3

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His  
65 70 75 80

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

Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 89

<211> 115

5 <212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 89

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

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

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

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

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

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Asp  
85 90 95

Gly Thr Asp Lys Thr Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr  
100 105 110

10 Val Ser Leu  
115

<210> 90

<211> 112

15 <212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 90

ES 2 908 009 T3

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

Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Asn Val Tyr Gly Asp Asn  
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu  
 35 40 45

Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln  
 65 70 75 80

Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Glu Phe Leu Cys Thr  
 85 90 95

Thr Ser Asp Cys Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Gly Val Val Val Arg  
 100 105 110

<210> 91  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Oryctolagus cuniculus

5

<400> 91

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

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

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

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

10

Arg Phe Thr Ile Ser Glu Thr Ser Thr Thr Val Glu Leu Lys Ile Thr  
 65 70 75 80

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Trp Thr  
 85 90 95

ES 2 908 009 T3

Tyr Asp Asp Tyr Gly Asp Phe Gln Gly Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Leu  
 115

<210> 92

<211> 111

5 <212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 92

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn  
 20 25 30

Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu  
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln  
 65 70 75 80

Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Asp Asp Asp  
 85 90 95

Ala Asp Met Gly Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys  
 100 105 110

10

<210> 93

<211> 111

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio variable de la cadena pesada

20 <400> 93

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

ES 2 908 009 T3

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Arg Asp Thr  
20 25 30

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

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

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

Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg  
85 90 95

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

<210> 94  
<211> 112  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> dominio variable de la cadena ligera

<400> 94

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

Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Asn Ser Asp  
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln  
65 70 75 80

Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Asp Cys Ser  
85 90 95

Ser Ala Glu Cys Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys  
100 105 110

15 <210> 95  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

ES 2 908 009 T3

<220>  
<223> conector peptídico

5 <400> 95

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Gly Gly Ser  
 20

10 <210> 96  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> conector peptídico

<400> 96

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 20 25 30

20 <210> 97  
<211> 536  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

25 <400> 97

Met Glu Phe Ser Ser Pro Ser Arg Glu Glu Cys Pro Lys Pro Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Arg Val Ser Ile Met Ala Gly Ser Leu Thr Gly Leu Leu Leu Leu Gln  
 20 25 30  
 Ala Val Ser Trp Ala Ser Gly Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ser Ser Val Val Cys Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser  
 50 55 60  
 Phe Asp Pro Pro Thr Phe Pro Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Glu  
 65 70 75 80

ES 2 908 009 T3

Ser Thr Arg Ser Gly Arg Arg Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln  
85 90 95

Ala Asn His Thr Gly Thr Gly Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln  
100 105 110

Lys Phe Gln Lys Val Lys Gly Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala  
115 120 125

Ala Leu Asn Ile Leu Ala Leu Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu  
130 135 140

Lys Ser Tyr Phe Ser Glu Glu Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val  
145 150 155 160

Pro Met Ala Ser Cys Asp Phe Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp  
165 170 175

Thr Pro Asp Asp Phe Gln Leu His Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp  
180 185 190

Thr Lys Leu Lys Ile Pro Leu Ile His Arg Ala Leu Gln Leu Ala Gln  
195 200 205

Arg Pro Val Ser Leu Leu Ala Ser Pro Trp Thr Ser Pro Thr Trp Leu  
210 215 220

Lys Thr Asn Gly Ala Val Asn Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro  
225 230 235 240

Gly Asp Ile Tyr His Gln Thr Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu  
245 250 255

Asp Ala Tyr Ala Glu His Lys Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu  
260 265 270

Asn Glu Pro Ser Ala Gly Leu Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu  
275 280 285

Gly Phe Thr Pro Glu His Gln Arg Asp Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly  
290 295 300

Pro Thr Leu Ala Asn Ser Thr His His Asn Val Arg Leu Leu Met Leu  
305 310 315 320

Asp Asp Gln Arg Leu Leu Leu Pro His Trp Ala Lys Val Val Leu Thr  
325 330 335

ES 2 908 009 T3

Asp Pro Glu Ala Ala Lys Tyr Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr  
 340 345 350

Leu Asp Phe Leu Ala Pro Ala Lys Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg  
 355 360 365

Leu Phe Pro Asn Thr Met Leu Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser  
 370 375 380

Lys Phe Trp Glu Gln Ser Val Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met  
 385 390 395 400

Gln Tyr Ser His Ser Ile Ile Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly  
 405 410 415

Trp Thr Asp Trp Asn Leu Ala Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp  
 420 425 430

Val Arg Asn Phe Val Asp Ser Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp  
 435 440 445

Thr Phe Tyr Lys Gln Pro Met Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys  
 450 455 460

Phe Ile Pro Glu Gly Ser Gln Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys  
 465 470 475 480

Asn Asp Leu Asp Ala Val Ala Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val  
 485 490 495

Val Val Val Leu Asn Arg Ser Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys  
 500 505 510

Asp Pro Ala Val Gly Phe Leu Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile  
 515 520 525

His Thr Tyr Leu Trp Arg Arg Gln  
 530 535

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo humanizado que se une específicamente al receptor de transferrina humano, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37.
2. El anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo humanizado tiene su función efectora inactiva.
- 10 3. El anticuerpo humanizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el anticuerpo humanizado es un anticuerpo multiespecífico que tiene al menos una especificidad de unión por el receptor de transferrina humano y al menos una especificidad de unión por una diana terapéutica.
- 15 4. El anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el anticuerpo humanizado comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une al receptor de transferrina humano y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a un antígeno cerebral.
- 20 5. El anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el antígeno cerebral se selecciona del grupo que consiste en Abeta, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), alfa-sinucleína, CD20, proteína precursora amiloidea (APP) y glucocerebrosidasa.
- 25 6. El anticuerpo humanizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que el anticuerpo multiespecífico se une tanto
- 30 i) al receptor de transferrina humano como a Abeta, o
- ii) al receptor de transferrina humano como a CD20, o
- 35 iii) al receptor de transferrina humano como a alfa-sinucleína, o
- iv) al receptor de transferrina humano como a fosfo-tau, o
- v) al receptor de transferrina humano como a glucocerebrosidasa.
- 40 7. El anticuerpo humanizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo humanizado es un anticuerpo biespecífico que comprende
- i) un primer sitio de unión que comprende un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 24 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37,
- y
- 45 ii) un segundo sitio de unión seleccionado de
- a) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 81 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 82, o
- 50 b) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 83 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 84, o
- c) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 85 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 86, o
- 55 d) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 87 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 88, o
- e) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 91 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 92, o
- 60 f) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 89 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 90, o
- 65 g) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 93 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 94, o



h) un dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 79 y un dominio variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 80.

- 5 8. El anticuerpo humanizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el anticuerpo humanizado es
- a) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG1, o
- 10 b) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG4, o
- c) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG1 con las mutaciones L234A, L235A y P329G,
- 15 d) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG4 con las mutaciones S228P, L235E y opcionalmente P329G,
- e) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG1 con las mutaciones L234A, L235A y P329G en ambas cadenas pesadas y las mutaciones T366W y S354C en una cadena pesada y las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C en la otra cadena pesada respectiva, o
- 20 f) un anticuerpo de longitud completa de la subclase humana IgG4 con las mutaciones S228P, L235E y opcionalmente P329G en ambas cadenas pesadas y las mutaciones T366W y S354C en una cadena pesada y las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C en la otra cadena pesada respectiva.
- 25 9. El anticuerpo humanizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el anticuerpo humanizado comprende
- i) una región Fc homodimérica de la subclase IgG1 humana opcionalmente con las mutaciones P329G, L234A y L235A, o
- 30 ii) una región Fc homodimérica de la subclase IgG4 humana opcionalmente con las mutaciones P329G, S228P y L235E, o
- 35 iii) una región Fc heterodimérica, en la que
- a) un polipéptido de la región Fc comprende la mutación T366W, y el otro polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A e Y407V, o
- 40 b) un polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366W e Y349C y el otro polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A, Y407V y S354C, o
- c) un polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366W y S354C, y el otro polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C,
- 45 o
- iv) una región Fc heterodimérica de la subclase IgG4 humana, en la que ambos polipéptidos de la región Fc comprenden las mutaciones P329G, L234A y L235A y
- 50 a) un polipéptido de la región Fc comprende la mutación T366W, y el otro polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A e Y407V, o
- b) un polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366W e Y349C y el otro polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A, Y407V y S354C, o
- 55 c) un polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366W y S354C, y el otro polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C,
- 60 o
- v) una región Fc heterodimérica de la subclase IgG4 humana, en la que ambos polipéptidos de la región Fc comprenden las mutaciones P329G, S228P y L235E y
- 65 a) un polipéptido de la región Fc comprende la mutación T366W, y el otro polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A e Y407V, o

b) un polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366W e Y349C y el otro polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A, Y407V y S354C, o

5 c) un polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366W y S354C, y el otro polipéptido de la región Fc comprende las mutaciones T366S, L368A, Y407V e Y349C.

10. Una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo humanizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

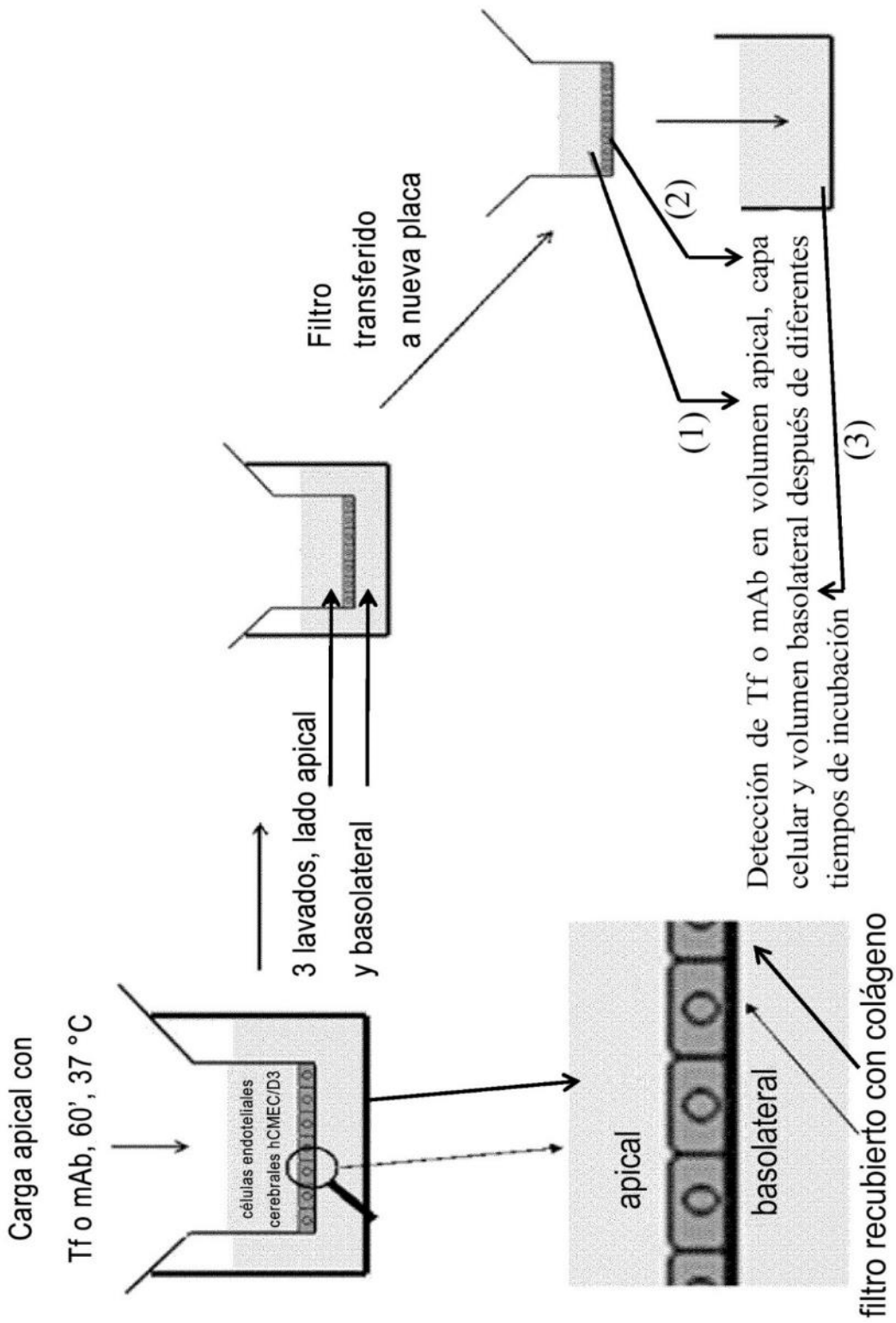
10 11. Un anticuerpo humanizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso como medicamento.

12. Un anticuerpo humanizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 para su uso en el tratamiento de un trastorno neurológico.

15 13. El anticuerpo humanizado para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el trastorno neurológico se selecciona del grupo que consiste en un trastorno neuropático, una enfermedad neurodegenerativa, cáncer, un trastorno por enfermedad ocular, un trastorno convulsivo, una enfermedad de almacenamiento lisosómico, amiloidosis, una enfermedad vírica o microbiana, isquemia, un trastorno del comportamiento e inflamación del SNC.

20

**Figura 1**



**Figura 1 (continuación)**

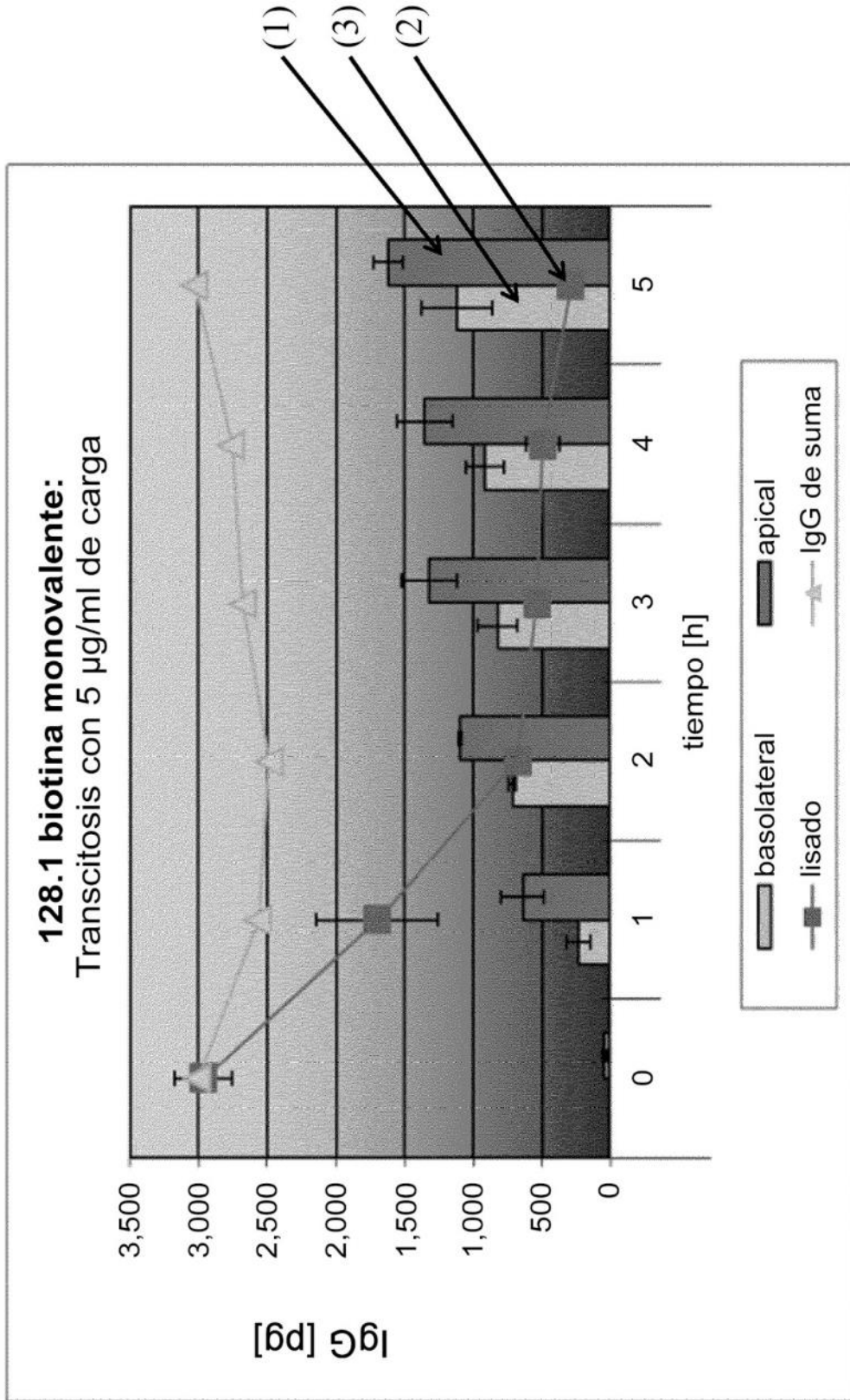
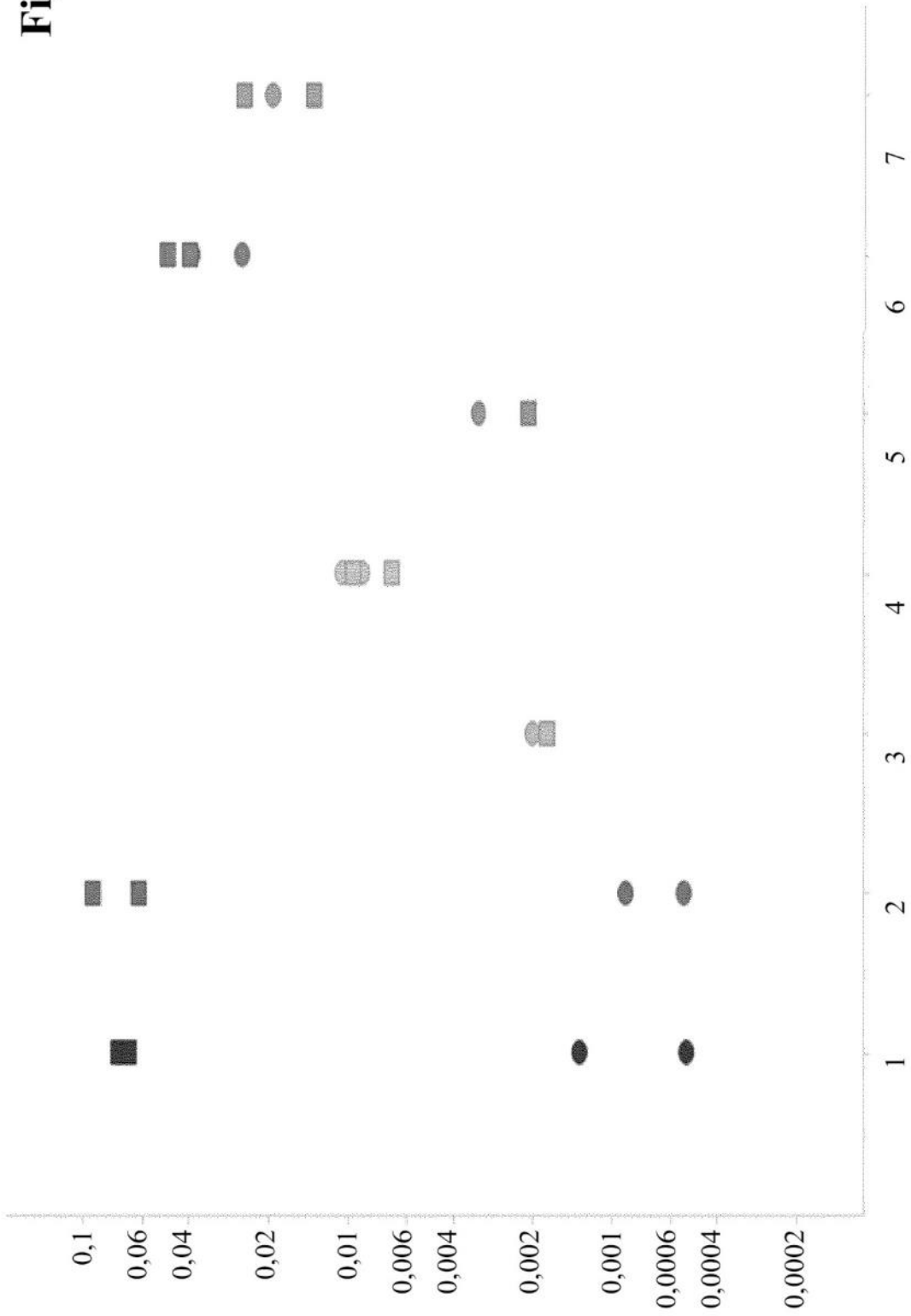


Figura 2



**Figura 3**

